

ソット肝臓線溶活性化酵素に関する研究

関 素 一 郎

①

ラット肝臓線溶活性化酵素に関する研究

— Studies on Rat Hepatic Plasminogen Activator —

第1章 線溶活性化酵素に関する基礎的研究 (Surgical Plasminogen
activation, 第1-2章) 総論

第2章 線溶活性化酵素の生成と分泌に関する研究 (第3-4章)
組織因子の作用

第3章 線溶活性化酵素が関与する腫瘍転移の過程 (第5-7章)
組織因子の作用

第4章 線溶活性化酵素と癌腫との関係に関する研究 (第8-9章)
組織因子の作用

第5章 線溶活性化酵素の生理的・病理的意義に関する研究
— 線溶活性化酵素と癌腫との関係 —

関 泰一郎

— 参考文献 —

謝辞

目次

— 序論 —	1
— 本論 —	
第1章 初代培養肝細胞における線溶活性化酵素 (hepatic plasminogen activator, h-P A) の産生	17
第2章 初代培養肝細胞が産生する線溶活性化酵素 (h-P A) の精製とその性質	34
第3章 初代培養肝細胞が産生する線溶活性化酵素 (h-P A) の免疫学的性質	70
第4章 初代培養肝細胞系における線溶活性化酵素 (h-P A) の産生調節機構	85
第5章 肝線溶活性化酵素の生理的・病態生理的作用の検討 — 実験的肝障害ラットにおける h-P A 産生の変動	108
— 総合討論 —	136
要約	145

159

序論

動物の体内を循環する体液の1つである血液は、脊椎動物では脈管（血管）という閉鎖された系の中を循環している組織と考えられ、体細胞の生活には不可欠な溶媒である。今日、血液の役割は教科書的にも酸素、ホルモン、栄養素の運搬、酸-塩基平衡、浸透圧、体温の調整維持、免疫機構、老廃物・代謝産物の運搬・排泄、血液凝固等の生体の生命維持に不可欠な役割を担っているとされている。

血液に関わる研究の中でも、出血、止血、血流の再開通という一連の現象、すなわち血液凝固・線溶現象の研究は自然止血機構の一環として、長い進化の歴史を含んでおり、古くから臨床例にもとづく研究が行われていた。さらに近年、食生活の欧米化による動脈硬化性疾患、血栓塞栓性疾患の増加による社会的要請に、分子生物学的研究手法の発展等の種々の要因が加わり、血液凝固・線溶に関する研究は加速度的に進展している。

本研究は、これまでに存在が知られていなかった肝臓が産生する線溶活性化酵素について、その存在、本態をはじめて明らかにするとともに、肝臓における産生調節機序、生理的・病態生理的役割について *in vivo*, *in vitro* の実験系を用いて追究した。

序論では、血液凝固線溶系について、これまでに明らかにされている知見を踏まえて概説し、肝線溶活性化酵素に関する本研究を行った背景について展望してみたい。

第1節 血液の凝固と線溶

1-1. 血液凝固のメカニズム

— 生体はいかにして出血を防止するか? —

出血は、循環血量を減少させ、生命維持に必須の脳、心臓等の重要臓器への血流量を減少させる。このような非常事態に対抗する生体の生理的防御機構として血液凝固系が存在する。

止血は、血管が損傷を受けた部位に、血流中に存在する無核の細胞である血小板が速やかに粘着、形態変化を起こし凝集することから開始される。この血小板系の反応は非常に速やかに起こる。ついでこの血小板凝集塊を不溶性のタンパク質である fibrin の大きな網が覆い、止血作用は完了する (Fig. I-1)。この fibrin 形成過程が血液凝固系である。

凝固系のメカニズムは、研究の進歩と共に年々複雑になってきている。

Fig. I-2 に、これまでに明らかにされている凝固系のスキームを示した。

凝固には血漿中に存在する 12 種類のタンパク質性の因子にカルシウムイオン、組織トロンボプラスチン、リン脂質 (血小板及び組織由来) を加え、15 種類の因子が関与しており、これらの因子による凝固の過程は、接触相における凝固の開始、リン脂質相活性化反応、fibrin 形成相に大別される。

凝固因子の多くは、不活性の前駆体として血流中に存在し、活性化により順次つぎの反応系を開始させるカスケードを構築している。このカスケードは一番最初の X II 因子の活性化から、安定化 fibrin の形成に至る間に非常に大きな増幅作用があり、最終的には数百万倍にも増幅され、目に見える形で fibrin 網の形成となるもので、出血という非常事態に備えている。

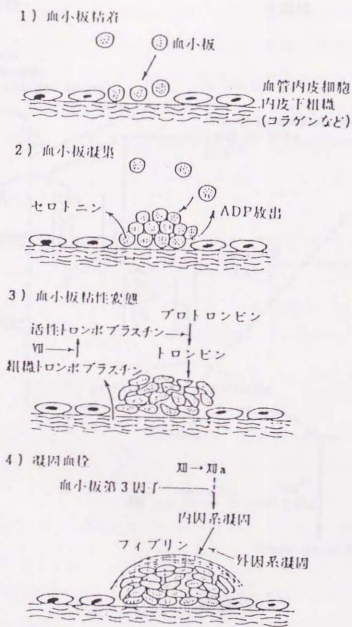


Fig. I-1. 止血機序¹⁾

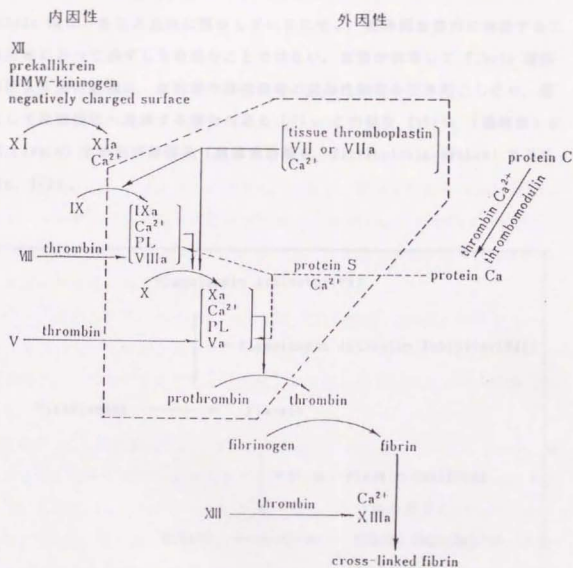


Fig. I-2. 血液凝固系¹⁾

1-2. 血液線溶系のメカニズム

— 血管内の血液の流動性はいかにして保たれているか? —

Fibrin 塊は、たとえ止血に関与しているにせよ、長時間血管内に存在することは生体にとって必ずしも有益なことではない。血管が狭窄して fibrin 塊形成部位より先の組織に、血栓症や塞栓症等の虚血性障害を引き起こしたり、器質化して動脈硬化へ進展する場合もある(2)。この様な fibrin (線維素)を溶解(lysis)する系が線溶系(線維素溶解系、fibrinolysis system)である(Fig. I-3)。

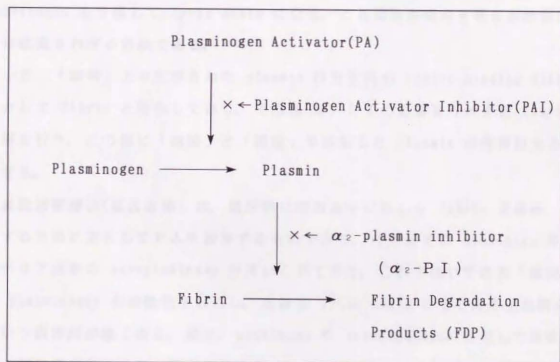


Fig. I-3. 線溶系 (Fibrinolytic System)

線溶は線溶酵素 plasmin により fibrin が可溶性の fibrin 分解産物 (Fibrin Degradation Products, FDP) に分解されることをいうが、 plasmin

は通常 plasminogen という zymogen として血流中を循環しており、酵素活性は見られない。Plasminogen は 790 個のアミノ酸残基からなる糖タンパク質であり (3,4)、plasminogen activator (以下 PA と略称する) の作用により Arg⁵⁶²-Val⁵⁶¹ が加水分解され plasmin となる (5)。

線溶現象は plasminogen の活性化が起こる場所により血漿中という「液相」と、fibrin という「固相」上に分けられる (6) (Fig.I-4)。仮に血漿中で PA の作用により plasmin が生成されると、 α_2 -plasmin inhibitor (α_2 -PI) と即座に複合体を形成し失活する。しかし血漿中に多量の plasmin が生じると、 α_2 -PI による失活が追いつかず、free plasmin が血漿中を循環し、fibrinogen を分解して lytic state になる。これは出血傾向を導き血栓溶解には歓迎されざる効果である。

一方、「固相」上で生成された plasmin は分子内の lysine binding site を介して fibrin と結合しており、その為 α_2 -PI の影響をうけずに fibrin 分解を行う。この様に「液相」と「固相」では生じた plasmin の作用は大きく異なる。

血栓溶解療法 (線溶療法) は、臨床的に循環血中に生じた fibrin を溶解、除去するために主として PA を投与するものであり、これまでに urokinase やバクテリア由来の streptokinase が用いられてきた。これらはいずれも「液相」で plasminogen の活性化をおこし、血液を lytic state にするため出血傾向という副作用が強く出る。最近、urokinase や streptokinase に対して組織型 PA が注目されている。組織型 PA が urokinase や streptokinase と大きく異なる点は fibrin 親和性が高いことであり、「固相」上で効率よく plasminogen の活性化を惹起することから、出血傾向を導くことなく血栓を特異的に溶解する作用が期待されている。そのため、fibrin のみを特異的に溶解する組織型 PA の研究が進められており、組織型 PA の臨床応用が試みられている。

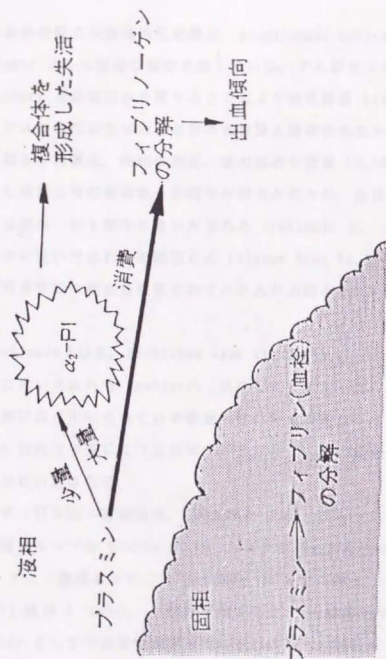


Fig. I-4. 「液相」と「固相」上でプラスミンの作用⁶⁾

第2節 線溶活性化酵素

線溶系の発動には線溶活性化酵素、plasminogen activator (以下PAと略称) が trigger として重要な役割を果たしている。PAはセリン酵素の一種であり、plasminogen を限定加水分解することにより活性酵素 plasmin に変換する。また、PAの作用は生体内における血栓除去機構のみならず、排卵(7,8)、組織の破壊及び再構成、細胞の遊走、癌の転移や浸潤(9,10)等の生体内の生理的ないし病理生理的諸現象への関与が明らかにされ、注目されている。

PAは現在、ヒト尿中に見いだされる urokinase と、メラノーマ細胞や種々の組織中に見いだされる組織型PA (tissue type PA, t-PA) の2種類の酵素学的、免疫学的に異なる性質を有するPAに大別されている。

I. Urokinase (UK, Urokinase type PA, u-PA)

尿中に見いだされる urokinase (以後UKと略す)は、脳血栓症や心筋梗塞等の治療に広く用いられている線溶活性化酵素であり、ヒト尿中には主に分子量 54 k の高分子型UK (HMW-UK) と 31 k の低分子型UK (LMW-UK) が見いだされる。

HMW-UKの一次構造は、1982年に Gunzler ら(11)により、LMW-UKは同グループの Steffens (12) らにより明らかにされた。HMW-UKは253アミノ酸残基よりなる分子量約30kのH鎖と157残基よりなる約20kのL鎖が1つのS-S結合で結ばれた2本鎖構造を有する (Fig. I-5)。Activatorとしての活性触媒部位はH鎖にあり、L鎖には plasminogen や prothrombin が有するのと同様なクリングル (Kringel) 構造を有する。



Fig. I-5. HMW-UK の一次構造^{1,11,12)}

Plasmin により図中矢印Aでペプチドが開裂してPro-UKがHMW-UKになる。さらに矢印Bで開裂するとC-末端側が低分子型UK (LMW-UK) になる。活性中心を構成するアミノ酸は★印で示した (Ser²⁵⁹, His²⁸⁴, Asn²⁵⁵)。糖鎖はAsp²⁸² に結合している。

II. 組織型 PA (t-PA)

尿中 PA である UK の存在及びその性質について述べたが、PA の生体内の局在は尿や腎臓に限局されたものではなく、種々の組織・体液に広くその存在が認められている。Table I-1 に Albrechtsen (14) による各種ヒト組織の PA 活性を検討した成績を示した。肝臓を除くほとんどすべての臓器、特に子宮、副腎、リンパ節、前立腺で高い t-PA 活性が観察された。さらに種々の培養細胞や癌細胞にも t-PA 活性が見いだされ、1983 年に Collen ら (15) によりメラノーマ細胞 (Bowes 株) が産生する t-PA の一次構造が明らかにされ (Fig. I-6)、さらに翌年 Ny ら (16) のグループにより t-PA 遺伝子の詳細な構造と機能についての論文が発表された。

Bowes 株の cDNA の塩基配列より明らかにされた t-PA の一次配列は UK とは異なり、非常に特徴的な構造を有していた。527 アミノ酸残基よりなる t-PA は、分子量約 72 k の糖タンパク質で 17 個の分子内 S-S 結合を有している。糖鎖の付加部位は 117, 184, 448 番目の Asn で、活性中心は light chain に存在し、His³²²、Asp³⁷¹、Ser⁴⁷⁸ からなる serine protease である。一次構造は N 末端より、finger domain, growth factor domain, kringle 1 domain, kringle 2 domain および catalytic domain からなる。UK には見られない t-PA の特徴として既述の fibrin 親和性が挙げられる。t-PA の fibrin 親和性は UK に比して非常に高く、血栓の主成分である fibrin に高い親和性を有するメラノーマ t-PA が、発見当初より有望な血栓溶解剤として注目されたのは言うまでもない。そこで t-PA の fibrin 親和性発現部位 (fibrin binding site, 以下 FBS と略す) について UK の一次構造と比較検討された。その結果 UK には存在しない finger domain が FBS であると考えられたが、実際には主要な FBS ではなく、Kringle 2 domain が主要な FBS であるとされた (17)。すなわち Kringle 2 domain を除去した t-PA は fibrin 存在下での plasminogen 活性化作用が減弱し、

Table I-1. ヒト組織および細胞培養液中のプラスミノゲン・アクチベーター^{13, 14)}

器官 (個体数)	活性 ^{a)}		培養細胞名	由 来	分 子 量 ^{b)}	UK 活性 ^{c)} (%) ^{d)}
	平均値	範 囲				
子 宮 (6)	720	450~900	IMR-90	胎児肺 (二倍体)	55,000~60,000; 73,000	65
副 腎 (15)	410	63~1,278	HEK	胎 児 腎	55,000~60,000; 80,000~90,000	99
リンパ節 (8)	378	16~1,278	Uveal melanocyte	ブドウ膜メラノサイト	ND ^{e)}	99
前立腺 (8)	334	81~630	Caki-1	腎 癌	55,000~60,000	99
甲状腺 (10)	325	189~504	Caki-2	腎 癌	63,000; 痕跡量, 55,000~60,000	0
肺 癌 (15)	223	38~638	Calu-3	肺 癌	55,000~60,000; 73,000	72
卵 巢 (5)	210	40~378	Detroit 562	咽 頭 癌	55,000~60,000; 73,000	20~50
下垂体 (6)	140	77~288	Malme-3 M	メラノーマ	73,000	0
腎 臓 (16)	119	0~342	RPM 1 8252	メラノーマ	73,000	0
筋 (14)	110	14~324	SK-MEL-2	メラノーマ	73,000	0
心 臓 (14)	82	27~144	SK-MEL-26	メラノーマ	73,000; 55,000~60,000	19
脂 肪 (10)	35	8~65	SK-MEL-27	メラノーマ	73,000; 55,000~60,000	13
精 巢 (8)	25	0~68	MeWo	メラノーマ	73,000	0
脾 臓 (9)	20	0~99				
肝 臓 (11)	0	0~6				

^{a)} 2 M KSCN 抽出液の標準フィブリン平板法による活性 (U/g 組織). ^{b)} SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による測定値.

^{c)} 未測定. ^{d)} UK 抗体による活性の中和量より算出

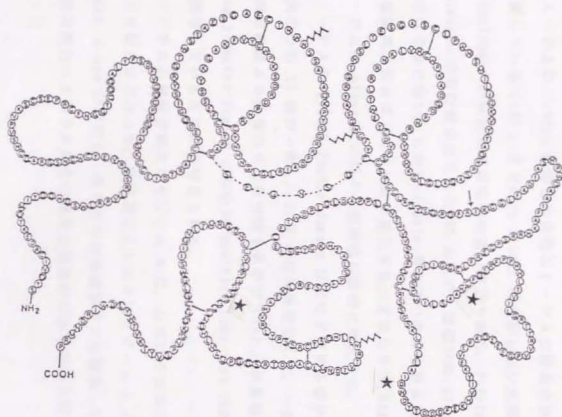


Fig. I-6. メラノーマ t-P A の一次構造^{1,15)}

Plasmin により Arg²⁷⁵-Ile²⁷⁶ (図中矢印) でペプチドが開裂し 2 本鎖構造になる。活性中心は★印で示した His³²², Asp³⁷¹, Ser⁴⁷⁹である。糖鎖は Asn¹¹⁷, Asn¹⁸⁴, Asn⁴⁴⁸ の 3 カ所に付加されたもの (type I) と Asn¹¹⁷, Asn¹⁸⁴ の 2 カ所のみのもの (type II) がある。

さらに Kribble 2 domain と finger domain の両方がない場合には fibrin に反応しなかった。FBS の構造は未だ同定されていないが、今後 t-PA の特徴的な生理作用発現部位として明らかにされるであろう。

t-PA の fibrin 親和性の特徴は t-PA の酵素作用発現部位の選択性に影響している (18)。すなわち fibrin の存在しない血漿中では、t-PA は plasminogen の活性化には効率の悪い酵素である。Fibrin 非存在下での plasminogen 活性化反応の K_m は $65 \mu M$ で、血漿中の plasminogen 濃度 ($2 \mu M$) よりはるかに高い。しかし fibrin 存在下での t-PA による plasminogen 活性化反応の K_m は $0.16 \mu M$ に変化する。すなわち fibrin に結合した状態の t-PA の plasmin に対する親和性は著明に増大する。

t-PA の growth factor domain は EGF の N 末端から 53 個のアミノ酸配列のうち 11 個が一致し、21% の相同性を示した。一般的に正常組織に比べ腫瘍組織はより多量の PA を分泌するので (19)、N 末端領域の構造、特に growth factor domain の存在が positive feed back 作用を有して腫瘍の生長に関与している可能性も考えられる。

t-PA の遺伝子はクロモソーム 8 に、UK はクロモソーム 10 に存在することが明らかとなった。興味深いことにクロモソーム 8 には発癌遺伝子 c-mos, c-myc が存在し、さらに白血病遺伝子とも関係していた (20)。これは細胞の癌化による PA 産生の増大と関連性があるのかも知れない。

第3節 肝線溶活性化酵素に関する研究

第2節で述べたように、PA は生体内の種々の組織・体液に存在が知られている。しかしながら、Albrechtsen ら (14) の報告に見るように肝臓における PA の産生は否定的で、肝臓や肝細胞が産生する PA に関する報告は少ない。

以下に肝臓や肝細胞のPAに関するこれまでの報告をまとめてみた。

Brian ら (21) は、fibrin-agar overlay 法を用いて初代培養肝細胞に fibrin 分解活性があることを報告したが、この fibrin 分解活性がPAによるものであるか否かについては言及していない。

Williams ら (22) は、初代培養肝細胞の培養期間中の形態変化及び生存率を電子顕微鏡、トリバンプルー染色法で検討し、これらと培養液並びに細胞のコラーゲン分解活性、中性プロテアーゼ活性、PA活性との関連について報告し、UKや plasminogen が肝細胞の deterioration を亢進させると報告した。

Sharoni ら (23) はラット単離肝細胞培養液、肝灌流液、血清中に共通の 80 kD のPAが存在することを報告した。

一方、著者らのグループの Ariga は哺乳動物の胆汁中にPAが存在することを見だし、その精製法を確立するとともに性質を明らかにし Bilokinase (以後BKと略称する)と命名した(24)。さらに、抗BK抗体を用いた蛍光抗体法によりBKの組織局在を検討し、BK抗原が主に肝実質細胞に、一部胆嚢粘膜、血管内皮に局在することを観察した。このことは、BKが肝実質細胞起源である可能性を示唆するとともに、肝にPAが存在することをはじめて免疫学的に証明した(25)。

本論文は、このような背景に基づき肝実質細胞におけるPA (hepatic PA, 以後これをh-PAと略称する、Fig. I-7) の産生とその調節、更にはh-PAの生理的意義について研究を行ったものである。

第1章ではラット初代培養肝細胞系を用い肝実質細胞が産生するh-PAについて細胞レベルでその存在を明らかにし、h-PA産生に適した肝細胞の培養法を確立した。

第2章では初代培養肝細胞培養液からのh-PAの精製を行い、精製h-

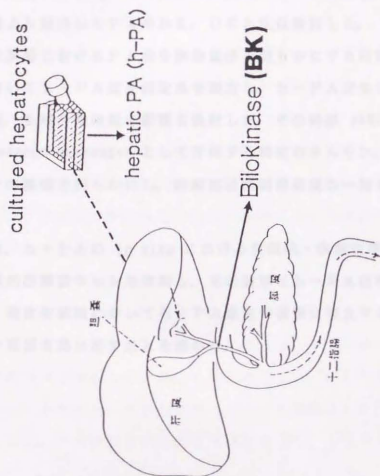


Fig. I-7. Bilokinase and hepatic plasminogen activator (h-PA)

PAのタンパク化学的性質、酵素学的性質について検討し、h-PAがいわゆる組織型PAに属するものであることを明らかにした。

第3章では、抗ラットh-PA抗体を作製し、h-PAの免疫学的性質について各種臓器より抽出したPAやBK、UKと比較検討した。

第4章では肝臓におけるPA産生調節機序を明らかにする目的で、初代培養肝細胞系を用いてh-PA産生測定系を確立し、h-PA産生に及ぼす各種ホルモン、薬剤、生理活性物質の影響を検討した。その結果 cAMP の analogue や cAMP を second messenger として作用する特定のホルモン、薬剤、グルココルチコイドの影響を明らかにし、肝線溶活性調節機構の一端をはじめて明らかにした。

第5章では、h-PAの *in vivo* における生理的・病態生理的役割を検討する目的で実験的肝障害ラットを作製し、その病態とh-PA活性の関連性について検討し、硬変肝組織においてh-PA産生が顕著に増大するという肝線溶活性の新しい局面を見いだすことを試みた。

— 本 論 —

第1章 初代培養肝細胞における線溶活性化酵素 (hepatic plasminogen activator, h-PA) の産生

【緒言】

肝臓は免疫グロブリンを除くほとんどの血漿タンパク質を合成しており、fibrinogenをはじめとする血液凝固因子や plasminogen 等の線溶系因子は肝臓で産生され、この意味で肝臓は生体内の血栓形成とその除去機構においても重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら序論でも述べたように肝臓や肝細胞の産生する plasminogen activator (PA) に関する報告は少なく、肝 P A の存在や生理作用に関してはほとんど知られていない現状である。

本章ではラット初代培養肝細胞における P A の存在、また肝 P A の酵素学的、タンパク化学的性質を明らかにすることを目的として、肝 P A の産生系について検討を加えることとした。その結果をもとに、肝細胞における P A の存在を確認するとともに、P A 産生に適した培養法を確立し、産生 P A の分子種の解析を試みた。

【方法】

① ラット初代培養肝細胞の単離・培養

肝実質細胞（以下肝細胞と略称する）は、Seglen ら (26) の方法を改良した中村ら (27) の方法に従い、市販の固形飼料 (C E - 2、日本クレア社) 及び水を自由に摂取させて飼育した体重 200g~250g の Wistar 系雄ラット (日本生物材料センター) より、collagenase の in situ 肝灌流法により消化した肝

臓より調製した。すなわち、門脈及び右心房付近より下大静脈に挿入したカニユーレに前灌流液 (Ca^{2+} , Mg^{2+} -free Hanks' BSS) を 30 ml/min の流速で 37 °C, 10 min 灌流後、collagenase 溶液 (100 mg/200 ml Hanks' BSS, pH 7.5, Type I, Sigma) を同温度、同速度で 10~20 min 門脈から下大静脈へ循環灌流させ結合組織を消化させた。消化後肝臓を摘出し、4 °C の Hanks' BSS (pH 7.2) 中で分散させ、pipetting 後、細胞濾過器で濾過した。その後遠心分離 (50 g, 1 min) を繰り返し肝細胞を精製した。精製した肝細胞の viability は trypan blue 排除試験 (28) により判定し、70 % 以上のものを用いた。

単離肝細胞は 50 ml 容培養 flask (3013, Falcon) 及び collagen (Cell Matrix Type-I, 新田ゼラチン) を coat した同 flask に inoculate し、insulin (10^{-8} M, Sigma), glucagon (10^{-8} M, Sigma), EGF (1.6 nM, マウス顎下腺、東洋紡) を含む WILLIAM'S E 培地 (以下 WE, Flow Laboratory) と、これにさらに 5 % の新生仔ウシ血清 (New Born Calf Serum, 以下 NBCS, 三菱化成) を添加した WE の両者を用いて培養を行った。培地交換は培養開始 4 時間後に行い、その後は 24 時間毎に行い回収した培地は遠心分離 (3,000 rpm, 5 min) 後 -20 °C で凍結保存した。

② 初代培養肝細胞における albumin 局在性の検討

初代培養肝細胞の albumin 局在性を Hamashima (29) らの蛍光抗体法に従って検討した。

スライドガラス上で培養した肝細胞を 4 % paraformaldehyde (in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4) 溶液で固定し、anti-rat albumin rabbit IgG (1:50, MBL) を 4 °C, 18 時間反応させた。余剰抗体を充分洗浄除去し、2 次抗体として FITC 標識 anti-rabbit IgG goat IgG を加え 37 °C, 1 時間反応させた。同様に 2 次抗体を洗浄除去後、蛍光顕微鏡 (Ultrophoto, Zeiss) で 515 nm のフィルターを用いて albumin の局在性を観察した。

③ 培養液中の P A 活性の測定 (standard fibrin plate 法)

培養液中の P A 活性は Astrup ら (30) の方法を改良した standard fibrin plate 法により測定した。

Fibrin plate は 0.35 % の plasminogen-rich bovine fibrinogen (in borate buffer saline, 75 % clotable, Miles Inc.) 溶液 8ml をプラスチックシャーレ (3003, Falcon) に注入後、0.1 M CaCl_2 1ml を加え攪拌しながら 20 IU/ml thrombin (in borate buffer saline, 持田製薬) 0.5 ml を加え、すばやく攪拌し室温に静置し作製した。この fibrin plate に試料溶液 30 μ l を spot し 37 $^{\circ}\text{C}$ 、18 時間 incubation 後、溶解窓の面積 (短径 \times 長径, mm^2) を測定した。

また、検出された fibrin 分解活性が protease による非特異的 fibrin 分解活性でなく plasminogen activator による活性であることを確認するために、plasminogen-free bovine plasminogen (ナカライテスク) を用いて同様に作製した plasminogen-free fibrin plate による活性測定も同時に行った。

④ 初代培養肝細胞の fibrinolysis autography による P A 活性の検討

初代培養肝細胞の P A 活性は Todd ら (31) の方法により検討した。

スライドグラス上で培養した肝細胞上に 0.6 % plasminogen rich bovine fibrinogen 溶液 (in borate buffer saline, pH 7.4) 120 μ l, 20 IU/ml thrombin (in borate buffer, pH 7.4) 20 μ l を乗せ、すばやく混和しスライドグラス上に均一に延ばして凝固させ、fibrin film を作成した。

加湿した 37 $^{\circ}\text{C}$ のチャンバー内で 24 時間 incubation 後、formaldehyde gas により固定し、Harris hematoxylin 染色液にて 30 分間染色した。methanol で脱色後、キシロール透徹し、顕微鏡下で細胞上の fibrin 溶解窓の有無を観察した。また、同時に 1 mM trans-methyl cyclohexane carboxylic acid (t-AMCHA) 含有 fibrin film を用いて同様の操作を行い溶解活性の阻害

の有無を観察した。

⑤ Zymography による PA 活性タンパクの分離・同定

初代培養肝細胞培養液中に分泌された PA 並びに細胞内 PA について PA 活性タンパクの分離と分子量測定を同時に行うために、Heussen ら (32) の方法を改良して fibrinogen を含有させた SDS-polyacrylamide gel を作製し、PA の zymography を行った。

7.5 % polyacrylamide gel は Laemmli ら (33) の方法に従って作製したが、これに終濃度 1.6 mg/ml の plasminogen-rich bovine fibrinogen を含有せしめた。垂直に保持したミニスラブ ($10 \times 7 \times 0.1$ cm) 内に分離 gel を作製し、ついで 5 % stacking gel を重層した。試料は等量の SDS 溶液 (2 % sucrose, 0.1 % phenol red 含有 5 % SDS 溶液) と混合した。この試料 10 μ l を gel に apply し 4 $^{\circ}$ C、8 mA の定電流で電気泳動を行った。泳動後、2.5 % Triton X-100 中に gel を静置し、SDS を除去後、0.15 M NaCl 含有 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 中で 37 $^{\circ}$ C、18-24 時間 incubate した。その後 0.075 % クマシ・リアント・ブルー R-250 溶液 (in 22.5 % メタノール/22.5 % スルサリル酸/7.5 % TCA) で染色、メタノール/酢酸/蒸留水 (1:1:6) の脱色液で脱色後 gel 内の fibrinogen 溶解部位を観察した。

【結果】

① 単離肝細胞の調製・初代培養並びにその線溶活性

本研究で collagenase 灌流法により単離した肝実質細胞 (以下肝細胞) の viability は trypan blue 排除試験により 85 % 以上であり、また単離肝細胞についての形態観察からその 97 % 以上が肝細胞であることを確認した。さらに肝特異機能である albumin 産生能についても組織免疫学的検討を行い、これ

を確認した。

初代培養肝細胞の albumin 産生能: Fig. 1-1. は anti-rat albumin rabbit IgG を用いた初代培養肝細胞における albumin 局在性を示す。6 時間培養後の肝細胞の 98 % に albumin の細胞内局在が認められ、単離した肝細胞は形態観察のみならず免疫化学的検討の結果からも肝実質細胞であることが明らかとなった。

初代培養肝細胞の P A 産生: 次に、培養肝細胞による P A 産生を個々の細胞について直接観察するために autography を行った。Fig. 1-2. にスライドグラス上で培養した初代培養肝細胞上に plasminogen-rich fibrin film を作製して行った fibrinolysis autography の結果を示す。溶解窓 (lysis area) は肝細胞周囲に一致して明瞭に認められた。これらの溶解窓は合成 plasmin 阻害剤 t-AMCHA (1mM) 含有 fiblin film および plasminogen-free fibrin film では観察されなかった。この結果、plasminogen-rich fibrin film に形成された溶解窓は非特異的な proteases による fibrin 分解によるものではなく、plasminogen activator により活性化されて生じた plasmin による fibrin 分解であることが明確となった。すなわち初代培養肝細胞が plasminogen activator を産生していることが明らかとなった (以後、この肝細胞が産生する plasminogen activator を hepatic plasminogen activator と呼称し、h-PA と略称する)。

② h-PA 活性を指標とした初代培養肝細胞培養法の検討

h-PA 活性を指標として、より効率的な肝細胞の培養法について検討した。特に本章では血清と培養器の h-PA 活性並びに肝細胞に及ぼす影響について検討した。Fig. 1-3., Fig. 1-4. にその結果を示す。

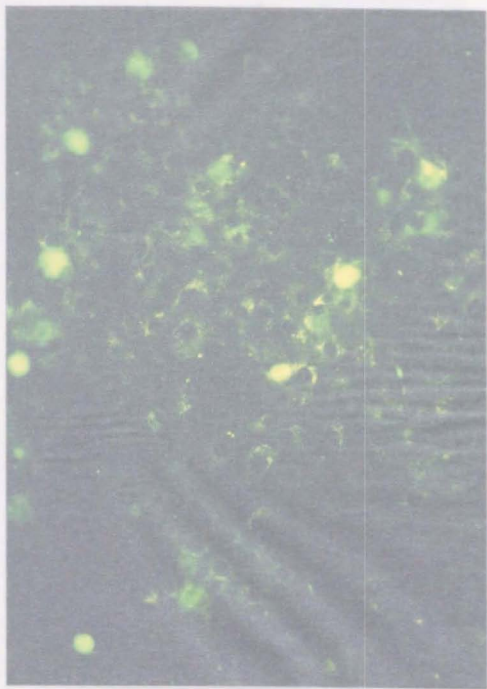


Fig. 1-1. Immunofluorescent staining of albumin in rat hepatocytes in primary culture. The sandwich method involving the reactions initially taking place between hepatocytes and anti-rat albumin rabbit IgG, and secondly between the hepatocytes and anti-rabbit IgG, FITC conjugate, was performed as described under "Materials & Methods". Magnification, X 216. Note that the fluorescence is localized in every cells.

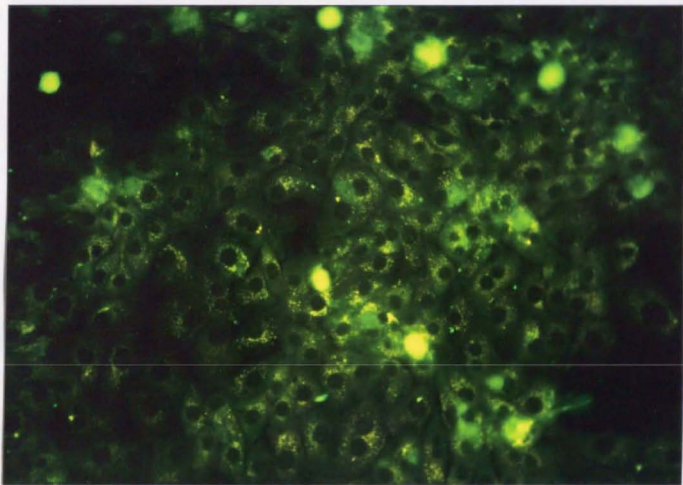


Fig. 1-1. Immunofluorescent staining of albumin in rat hepatocytes in primary culture. The sandwich method involving the reactions initially taking place between hepatocytes and anti-rat albumin rabbit IgG, and secondly between the hepatocytes and anti-rabbit IgG FITC conjugate, was performed as described under "Materials & Methods". Magnification, X 216. Note that the fluorescence is localized in every cells.



Fig. 1-2. The fibrinolysis autography of rat hepatocytes in primary culture. The cells were covered with plasminogen rich fibrin film, and incubated at 37°C for 24 hrs. Fixation and staining of the film were performed by using formaldehyde-gas and hematoxylin solution, respectively. The clear lysis zones were observed around the hepatocytes. The fibrinolytic activity was completely inhibited by t-AMCHA (1mM). Magnification, X 216.

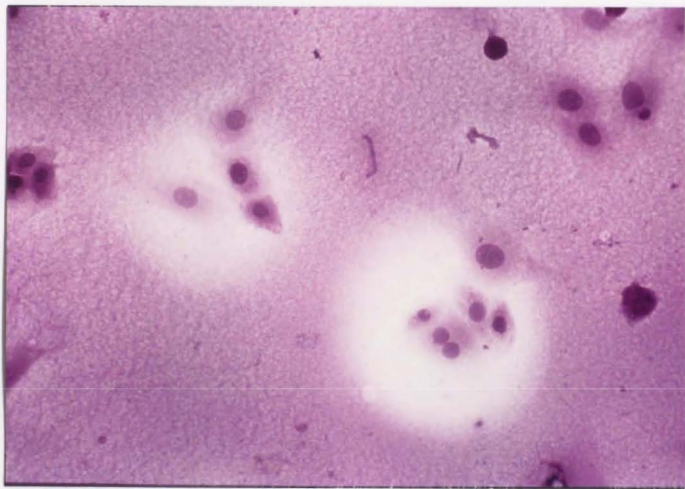


Fig. 1-2. The fibrinolysis autography of rat hepatocytes in primary culture. The cells were covered with plasminogen rich fibrin film, and incubated at 37°C for 24 hrs. Fixation and staining of the film were performed by using formaldehyde-gas and hematoxylin solution, respectively. The clear lysis zones were observed around the hepatocytes. The fibrinolytic activity was completely inhibited by t-AMCHA (1mM). Magnification, X 216.

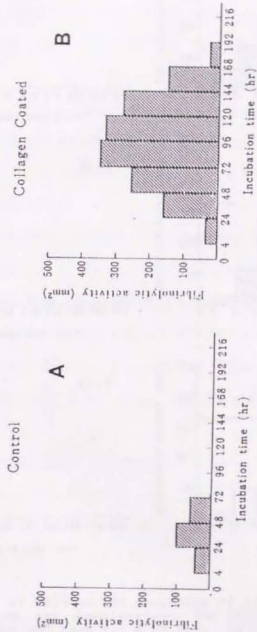


Fig. 1-3.

Effect of collagen coating on the secretion of plasminogen activator by cultured rat hepatocytes in primary culture. When the cells were cultured in the flask of collagen-uncoated, the activator activity was only given in the medium for up to 72 hr and its level was less than 100 mm²(A). On the contrary, collagen coated flask gave extremely high activity (more than 300 mm² in 96 hr medium) and the medium containing activator was able to be obtained for up to 192 hr (B).

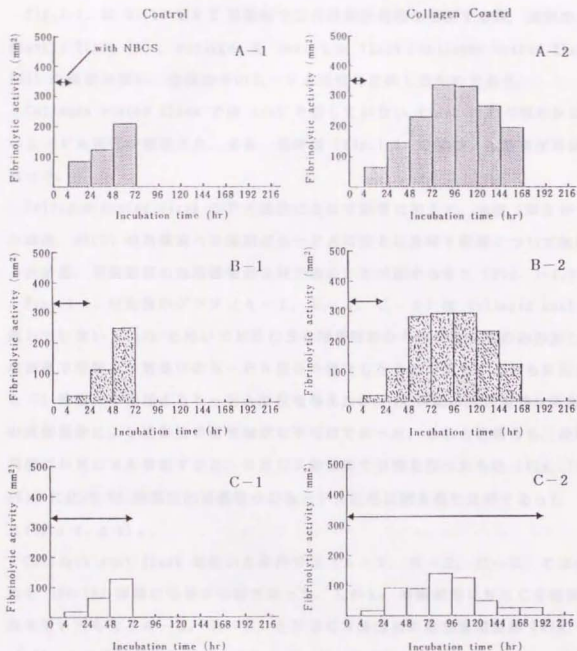


Fig. 1-4. Effect of NBSC on the secretion of plasminogen activator from cultured rat hepatocytes. The NBSC was added at the initial stage and kept for 4 hr (A), 24 hr (B) and whole time of cultivation (C), see arrows in the graphs. The group 1 (the three graphs of the left side) was the cases that cultures were performed in the collagen-uncoated flask, and the group 2 (the three graphs of right side) was that from collagen-coated flask.

Fig.1-3. は WILLIAM'S E 培養液で初代培養肝細胞を培養する際、通常の plastic flask (A)と collagen を coat した flask (collagen coated flask (B)) の両者を用い、培養液中の h-P A 活性を比較したものである。

Collagen coated flask では coat を施していない flask に比べ明らかに高い h-P A 活性が観察され、また、長時間 (Fig.1-3. の横軸) の培養が可能であった。

Collagen coated flask の P A 活性に及ぼす影響に加えて、血清 (新生仔ウシ血清、NBCS) の培養液への添加が h-P A の産生に及ぼす影響について検討した結果、培養初期の血清添加が良好であることが認められた (Fig. 1-4.)。

Fig. 1-4. の左側のグラフ (A-1、B-1、C-1) は collagen coat を施していない flask を用いて NBCS を培養開始から矢印の時間のみ添加した培養液で培養し、培地中の h-P A 活性を測定したものである。これらは何れも 72 時間まで漸増する h-P A 活性を与えたが、72 時間以上の培養は肝細胞の剥離現象により培養及び活性測定は不可能であった。これらの場合も、培養初期に NBCS を添加すると、NBCS 無添加で培養を行ったもの (Fig. 1-3 (A)) に比べ 72 時間目の培養液中の h-P A 活性は約 5 倍と良好であった (Fig.1-4, A-1)。

Collagen coat flask を用いた条件では (A-2、B-2、C-2) では何れも 168-192 時間の培養が可能であった。しかし、培養初期に NBCS 添加培地を用いたもの (A-2、B-2) と NBCS 無添加の無血清培養群 (Fig. 1-3(B)) との間には顕著な差は見られず、何れも 72~120 時間に h-P A 活性のピークが見られた。

NBCS 添加培地で培養を継続した群の h-P A 活性は他の群に比べ著しく低いものであった。これは血清中に存在する線溶系や P A に対する阻害物質により、産生された h-P A の活性が 2 次的に抑制された為と考えられる。

Fig. 1-5. に collagen coated flask で培養した肝細胞の位相差顕微鏡写真を示した (Fig. 1-3.(B)の細胞)。Inoculate した肝細胞 (A) の 80 % 以上は 4 時間以内に培養面に接着し (B)、pavement-like 形態の monolayer を形成し、これらのほとんど全てが肝細胞であることがわかる。培養 72 時間後には、肝細胞は培養面全面に増殖 spreading し confluent の状態となった (C)。

③ 初代培養肝細胞が産生する h-P A の zymography による分析

Fig. 1-6. に培養液中の h-P A 及び初代培養肝細胞内 h-P A の fibrinogen 含有 10 % polyacrylamide gel を用いて行った zymography の結果得られた zymogram を示す。

初代培養肝細胞培養液中の P A 活性は分子量 60 k の位置に明瞭な溶解窓を示した。溶解窓の大きさは fibrin plate 法で得られた活性量と相関していた。また、培養 48, 72 時間目までの培養液では 60 k の h-P A の他に高分子型 U K と低分子型 U K の間に泳動される分子量約 40 k の P A 活性が検出された。一方、細胞内 h-P A 活性は培養液中の h-P A 活性と同様の増減傾向を示したが、培養液中に観察された低分子型 h-P A は観察されなかった。

なお、control としてヒト尿中 P A である urokinase (以下 U K) を用いたが、上側の溶解窓は高分子型 U K、分子量 54 k、下側の溶解窓は低分子型 U K、31 k である。

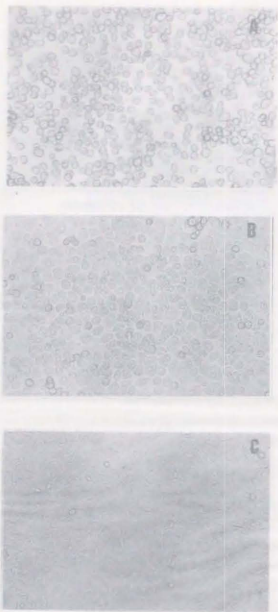


Fig. 1-5. Phase contrast photomicrographs of rat hepatocytes cultured in the flask coated with collagen (corresponding to Fig. 1-3.(B)). Photographs show that the monolayer was almost consisted of hepatocytes without contamination of non-hepatic cells. A : hepatocytes immediately after inoculation. B : hepatocytes cultured for 4 hr. Hepatocytes were grown spreading on the surface of collagen-coated flask and formed monolayer with a pavement-like epithelial morphology. Several dividing hepatocytes are seen. C : hepatocytes cultured for 72 hr. Hepatocytes are fully spreading and contact closely to one another.

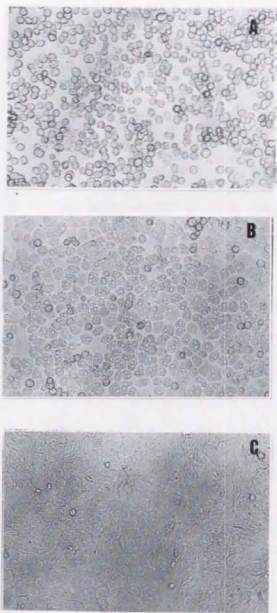


Fig. 1-5. Phase contrast photomicrographs of rat hepatocytes cultured in the flask coated with collagen (corresponding to Fig. 1-3.(B)). Photographs show that the monolayer was almost consisted of hepatocytes without contamination of non-hepatic cells. A : hepatocytes immediately after inoculation. B : hepatocytes cultured for 4 hr. Hepatocytes were grown spreading on the surface of collagen-coated flask and formed monolayer with a pavement-like epithelial morphology. Several dividing hepatocytes are seen. C: hepatocytes cultured for 72 hr. Hepatocytes are fully spreading and contact closely to one another.

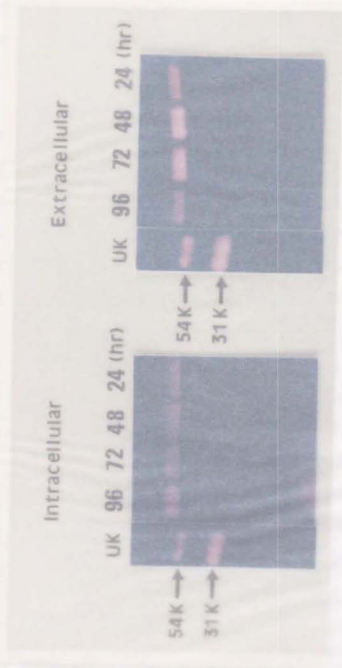


Fig. 1-6 Zymography of intracellular h-PA and the h-PA secreted in conditioned medium. Human urokinase (UK) was also subjected to the gel electrophoresis, and the upper lysis area was due to the high molecular weight type UK (54 kD) and the lower one, to the low molecular weight form (31 kD). Rat hepatocytes, in primary culture produce a PA of 60 kD and secreted it into their culture media. A low molecular weight type of h-PA was found in culture media, but not in cellular extract.



Fig. 1-6.

Zymography of intracellular h-PA and the h-PA secreted in conditioned medium. Human urokinase (UK) was also subjected to the gel electrophoresis, and the upper lysis area was due to the high molecular weight type UK (54 kD) and the lower one, to the low molecular weight form (31 kD). Rat hepatocytes in primary culture produce a PA of 60 kD and secreted it into their culture media. A low molecular weight type of h-PA was found in culture media, but not in cellular extract.

【考察】

PA は種々の組織、体液や培養細胞に存在が明らかにされているが肝臓や肝細胞のPAの存在に関してはほとんど知られていない。本章では初代培養肝細胞がPAを産生していること、またその活性タンパクの分子量、局在性等を初めて明らかにした。

初代培養肝細胞は、hepatoma 細胞、肝癌細胞の様な cell line とは異なり *in vivo* 同様の肝機能を有している (34)。本研究で用いた collagenase 灌流法によって単離された肝細胞は、初代培養すると肝特異機能である albumin の産生を、anti-rat albumin 抗体を用いた蛍光抗体法により確認した。Albumin の合成・分泌は培養初期より認められた。このことから本研究で調製・培養した細胞は形態のみならず、分化機能の面からも肝細胞であることが明らかとなった。

このような初代培養肝細胞によるPA産生の有無を検討するために、plasminogen-rich fibrin film を用いて fibrinolysis autography を行ったところ細胞周囲に一致して明瞭な溶解窓の形成が認められた。これらの溶解窓は plasminogen-free fibrin film や、合成 plasmin 阻害剤、t-AMCHA (1mM) 含有 fibrin film では観察されないことから、肝細胞にPAが存在することが明らかになった。これまでに Albrechtsen ら (14) や Ende ら (35) は、肝臓のPAや肝実質細胞のPAに関して極めて僅かのPA活性、もしくはPAは存在しないと報告している。これらの組織抽出液のPA活性を指標とした研究では、肝臓のように線溶系酵素の阻害物質を多量に産生する臓器ではPA活性が見逃されてしまった為と思われる。現に著者が肝臓のロダン塩により抽出したPA画分の活性測定や、肝組織について行った fibrinolysis autography の成績も、PA活性は極めて弱いものであるか検出されなかった。しかし、今回行った無血清初代培養肝細胞系において肝細胞にPAが存在することがはじめ

て明らかとなった。

本章では、insulin, glucagon, EGF を添加した培養液を用いた。これらのホルモンの h-P A 産生に及ぼす影響については第 4 章で詳述するが、基本的に肝細胞の無血清培養において機能維持に必要とされている insulin, glucagon と、長期間の培養においては P A 産生機能維持に効果がある EGF を添加して培養を行った (36)。

これらの条件で培養を行った肝細胞において、h-P A 活性はホルモン処理 6 時間後の細胞では検出されなかったが、処理 24 時間後の細胞では全細胞の約 50 % に、また 48 時間以後の細胞では約 80 % の細胞に P A 活性が認められた。一般に単離直後の肝細胞は collagenase 消化による細胞膜損傷等によりホルモン応答能をはじめとする細胞機能、代謝機能、DNA 合成能は低下しており、これらの機能低下は数時間から 1 日の初代培養により *in vivo* 同様の機能を回復することが知られている (37)。したがって、初代培養肝細胞における h-P A 産生は肝細胞機能、代謝機能と密接に関連している可能性が示唆された。

本章では培養器の collagen coat 並びに培養液への血清添加が肝細胞機能、h-P A 産生に及ぼす影響についても検討した。初代培養肝細胞は通常、特に単離肝細胞を培養器へ接着させる培養初期に、insulin, dexamethasone 等の supplements に加え 5~10 % の血清を添加した培養液を用いることが普通である。これは血清中の fibronectin, vitronectin 等の細胞接着因子が培養器への肝細胞の接着・進展 (単層形成) に必須であるのみならず、血清中の既知・未知の因子が collagenase 消化により損傷を受けた細胞の修復、培養による機能発現に有利に働くことや細胞生存促進作用を有するからである。しかし、培養細胞を用いた有用物質の生産や培養液中に産生された有用物質の精製を行う場合、血清含有培地からの精製は困難を極める。また、血清中には α_2 -macroglobulin, α_2 -plasmin inhibitor, α_1 -protease inhibitor 等の plasmin や

PAの阻害物質の存在が知られており(38, 39)、h-PAの様な血液凝固・線溶系関連因子の研究を行う場合、血清の存在は活性測定に支障をきたす場合が多い。また、ウシ大動脈内皮細胞においては未知の血清成分がPA産生を抑制することも指摘されている(40)。

そこで培養液中からのh-PAの精製を行う為に collagen を用いた無血清培養系の確立を試み、肝細胞の接着性、機能発現に及ぼす collagen の影響について検討を行った(41)。

今回得られた結果から collagen coated flask を用いれば無血清培養でも細胞は充分培養面に接着し、かつ長時間の培養が可能であり、その結果培養液中に強いh-PA活性を得ることができると判断された。Collagen は細胞の増殖、形態形成、分化機能の発現と維持に重要な役割を果たしている。また、基質に依存して増殖する細胞の生存、増殖はガラスやプラスチック基質上に比べて collagen 基質上でより促進される(42)。

肝細胞の無血清条件下での初代培養においては種々の trypsin-like protease inhibitor の培養液への添加が初代培養肝細胞の生存促進に有効であり、その強度は aprotinin > α_2 -plasmin inhibitor > soybean trypsin inhibitor > α_1 -antitrypsin = α_2 -macroglobulin であると報告されている(43)。しかし、これらの inhibitor を添加しなくても collagen coated flask 上では初代培養肝細胞を長期間維持することが可能であり、以後この無血清培養系を用いてh-PAの精製、性質の検討を行うこととした。

さらに本章ではh-PAの分子種について、PAの分離・同定を同時に行うことが可能な zymography を用いて検討した。

無血清初代培養肝細胞の抽出液、培養液の zymogram は、分子量約 60 k の位置に doublet の溶解窓を示し、h-PAは human UK (分子量 54 k, 31 k) とは明らかに区別された。この doublet の溶解窓は、既述のヒト melanoma

t-P Aで明らかにされているのと同様に付加される糖鎖の種類、付加条件の違いによるものと考えられる(序論、Fig. I-6)。細胞内に存在するh-P Aと培養液中に分泌されたh-P Aは zymogram 上で同一であり、また両者の培養時間の経過による活性の変動が同様な挙動を示すことから、h-P Aは初代培養肝細胞により絶えず一定の速度で合成・分泌されていると考えられた。

しかし、培養液中では分子量 60 k の h-P Aの他に低分子型 h-P Aの存在も認められた。この低分子型 h-P Aは 48 時間目、72 時間目の培養液で顕著に観察され、これらは aprotinin (2 U/ml) を添加した培地で培養した培地中では観察されず、h-P Aが細胞内で合成後、分泌される際、もしくは分泌後培養液中で aprotinin 感受性の酵素により何等かの processing を受けて生じたものであると考えられた。

Bernik ら (44) は腎培養細胞において分泌される P Aの分子種が培養日数と共に変化することを報告しているが、初代培養肝細胞においては、この様な現象は観察されず分子量 60 k の P Aが分泌されていることが明らかとなった。

第2章 初代培養肝細胞が産生する線溶活性化酵素 (h-PA)

の精製とその性質

【緒言】

前章において、初代培養肝細胞がPAを産生することを明らかにし、初代培養肝細胞培養中に分泌されたPA (h-PA) について zymography を用い、その分子種について検討を行った。

本章では、初代培養肝細胞培養液からのh-PAの精製法を確立し、この方法に従いh-PAの単離精製を試みた。また、精製h-PA標品の酵素学的、タンパク化学的性質について、尿中PAであるurokinase (UK) や胆汁路系PAであるbilokinase (BK) と対比して検討し、初代培養肝細胞が産生するh-PAの性質について明らかにしようと考えた。

【方法】

① 初代培養肝細胞培養液からのh-PAの精製

肝細胞は第1章で述べた collagenase 灌流法により単離、調製後、collagen (Cell Matrix, Type-I, 新田ゼラチン) coating を施した培養 flask に inoculate し、insulin (10^{-6} M, Sigma), glucagon (10^{-6} M, Sigma), EGF (1.6 nM, 東洋紡), aprotinin (2 IU/ml) に加え、h-PA産生を顕著に増大させる dibutyryl cAMP (10^{-6} M, Sigma) を添加した WILLIAM'S E (Flow Laboratory) 培養液中で培養した (第4章参照)。培養液は培養開始4時間後に交換し、以後24時間毎に新鮮培地に交換し、24時間目以降の培養液は回収後3,000 rpm, 5 min 遠心分離し、培養上清を -20°C で貯蔵し、h-PA精製の出発材料とした。

培養液中からの h-P A の精製は、CM-Sepharose によるイオン交換クロマトグラフィー、Arginine-Sepharose (以下 Arg-Sepharose) , Benzamidine-Sepharose を用いたアフィニティークロマトグラフィーを組み合わせた方法により行った (Fig. 2-1) 。 h-P A は精製過程においてガラス等の陰性に荷電した表面に吸着されやすいので、h-P A のガラス表面等への吸着を避けるため、全ての buffer に界面活性剤 Tween 80 を添加した。

精製過程におけるタンパク量の測定は、Bio Rad protein assay kit (Bio Rad) を用いて、h-P A 活性は fibrin plate 法により ヒト melanoma t-P A (TC-41072, Technoclone) を standard として測定した。各画分の h-P A の精製度は zymography、並びに Superose 12 column を用いた F P L C により検討した。

② h-P A の諸性質の検討

1) h-P A の fibrin 親和性の検討

h-P A の fibrin 親和性は Fibrin-Sepharose 4B column を用いて検討した。

Fibrin-Sepharose 4B は Lysine-Sepharose 4B column により plasminogen-free にしたヒト fibrinogen (Grade I, Kabi Vitrum 社) を BrCN により活性化した Sepharose 4B にリガンドして調製した。すなわち蒸留水で洗浄した Sepharose 4B (Pharmacia) を等量の蒸留水に懸濁し 100 mg/Sepharose 4B 1ml の割合で BrCN を加え 4N NaOH で pH を 11.0 に調整しながら 8 分間反応させ活性化させた。活性化 Sepharose 4B は 0.1 M NaHCO_3 , pH 9.0 で充分洗浄し、等量の同 buffer に懸濁させた。このゲルに、直ちに plasminogen-free fibrinogen を加え (300 mg fibrinogen/100 ml Sepharose) 、4 °C で一夜攪拌し、fibrinogen をリガンドした。反応後ゲルは 0.38 % sodium citrate, 0.15 M NaCl 含有 0.04 M borate buffer, pH 7.8 で洗浄し、リガン

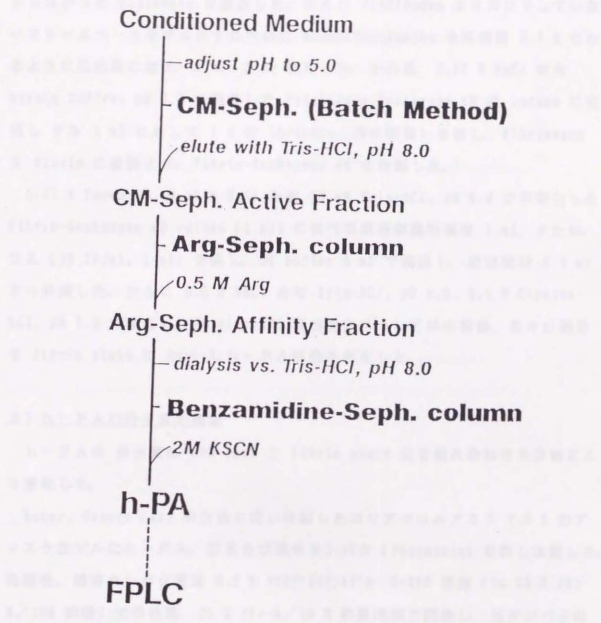


Fig. 2-1. Purification procedure of h-PA.

ドしなかった fibrinogen を除去した。さらに fibrinogen をリガンドしていないフリースペースをマスクするために monoethanolamine を終濃度 0.2 M になるように反応系に加え、4 °C, 2 hr 攪拌した。反応後、0.15 M NaCl 含有 borate buffer, pH 7.8 で洗浄した Fibrinogen-Sepharose 4B は column に充填し、ゲル 1 ml に対して 1 U の thrombin (持田製薬) を流し、fibrinogen を fibrin に変換させ、Fibrin-Sepharose 4B を作製した。

0.01 % Tween 80, 0.15 M NaCl 含有 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 で平衡化した Fibrin-Sepharose 4B column (1 ml) に初代培養肝細胞培養液 1 ml, または、UK (10 IU/ml, 1 ml) を供し、同 buffer 5 ml で溶出し、溶出液は 0.5 ml ずつ分画した。さらに 0.5 M NaCl 含有 Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M Glycine-HCl, pH 3.0 で溶出し、Glycine-HCl 溶出画分については中和後、各々の画分を fibrin plate に spot し h-PA 活性を測定した。

2) h-PA の分子量の測定

h-PA の分子量は SDS-PAGE と fibrin plate 法を組み合わせた方法により測定した。

Weber, Osborn (45) の方法に従い作製したポリアクリルアミド 7.5 % のディスク型ゲルに h-PA、UK 及び標準タンパク (Pharmacia) を供し泳動した。泳動後、標準タンパク質は 0.2 % マシマ・リファクトール R-250 溶液 (in 25 % メタノール/10 % 酢酸) で染色後、25 % メタノール/10 % 酢酸溶液で脱色し、各タンパクの Rf 値を算出した。

h-PA 及び UK を泳動したゲルは 2.5 % Triton X-100 溶液に 2 時間浸し、SDS を除去後、ゲルを上部より 2 mm 間隔でスライスし、スライスしたゲル中の PA 活性を fibrin plate 法により測定した。PA 活性の認められたゲルより h-PA、UK の Rf を算出し、h-PA の分子量を求めた。

3) h-PA の plasminogen 活性化能の検討

h-PA の plasminogen 活性化能について前述の fibrin plate 法、各種合成基質 (Table 2-1) を用いた方法により比較検討した (Fig. 2-2)。

Table 2-1. Chromogenic Substrate for PAs and Plasmin.

Substrate	Formula	Enzyme for Assay
S-2288	H-D-Ile-Pro-Arg-pNA	t-PA
S-2444	H-D-Glu-Gly-Arg-pNA	UK
S-2251	H-D-Val-Leu-Lys-pNA	plasmin

S-2288 による h-PA 活性の測定:

t-PA 特異合成基質 S-2288 (Kabi Diagnostica) の分解能は 60 IU/ml (ヒト UK 換算) の h-PA を 0.1 % BSA, 0.15 M NaCl 含有 Tris-HCl, pH 8.0 で倍々希釈し、0.1 ml の h-PA と 0.1 ml の S-2288 溶液 (0.3 mg/ml in 20 mM Tris-HCl, pH 8.5) を 96 well microplate 中でよく混合し、37 °C, 6 hr インキュベーション後、遊離した p-nitroaniline (pNA) 量、すなわち 405 nm の吸光度を IMMUNOREADER (NJ-2000, InterMed) を用いて測定した。

h-PA の S-2288 に対する Km 値はイニシャルレート法により測定した。予め 37 °C に保温したセミマイクロキュベット内で 20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 0.2 ml, 0.5 IU/ml h-PA 0.2 ml, さらに種々の濃度の S-2288 溶液 (in

20 mM Tris-HCl, pH 8.5) 0.2 ml を加えよく攪拌し、加温器付き分光光度計 (UV-240, 島津製作所) により 405 nm の吸収を経時的に記録した。

得られた結果から Lineweaver-Burk plot を行い h - P A の S-2288 に対する K m 値を算出した。

S-2251 を用いた方法:

合成基質 S-2251 は plasmin により分解されて pNA を遊離する (Fig.2-2)。この pNA 量を測定することにより、P A 活性を求めることができる。S-2251, plasminogen, fibrinogen 由来の stimulator を用いる P A 活性の測定は Verheijen ら (46) の parabolic assay 法に従い以下のように測定した。

測定に必要な plasminogen-free fibrinogen と plasminogen は、それぞれ ヒト fibrinogen とヒト血漿を、Lys-Sepharose 4B column に供して調製した。

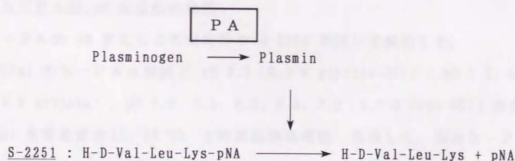


Fig. 2-2. Measurement of plasminogen activator activity by using a synthetic substrate for plasmin (parabolic assay) .

Stimulator は plasminogen-free fibrinogen (5 mg/ml in formic acid) 溶液に 1.3 倍量の BrCN を加えて 17 時間常温で反応させ、蒸留水に一夜透析して調製した。この BrCN 分解物を stimulator として PA 活性の測定に用いた。

Plasminogen activator 溶液、plasminogen (0.1 mg/ml) 溶液、S-2251 (0.06 mM) 溶液、0.2 M NaCl, 0.01 % Triton X-100 含有 0.05 M Tris-HCl, pH 8.8 および stimulator をそれぞれ 50 μ l ずつ 96 well microplate に加えて混合後、37 °C で 0, 30, 60, 90, 120 min インキュベーションし、405 nm の吸光度を IMMUNOREADER により測定した。

4) h-PA の至適 pH の検討

pH 4.0, 5.0, 6.0, 6.5 (0.1 M acetate buffer), pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 (0.05 M Tris-HCl) の buffer を用いて 30 IU/ml の h-PA 溶液を調製した。各 pH における h-PA 活性を S-2288 を用いて測定し、至適 pH を検討した。

5) h-PA の pH 安定性の検討

h-PA の pH 変化による安定性を S-2288 を用いて検討した。60 IU/ml の h-PA 水溶液と pH 2.0 (0.2 M glycine-HCl), pH 4.5, 6.0 (0.1 M acetate), pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 (0.5 M Tris-HCl) の各 buffer を等量混合し、60 °C、1 時間加熱処理後、急冷した。残存 h-PA 活性は fibrin plate 法により測定した。

6) h-PA の熱安定性の検討

30 IU/ml の h-PA を 0, 37, 60, 80 °C の各温度で、各々 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min 熱処理し、直ちに水冷した。残存 h-PA 活性は S-2288 を用いた方法により測定した。

7) h-P A の等電点の測定

h-P A の等電点は Ampholine を用いた等電点電気泳動法により測定した。Ampholine は pH 3.0~10.0, pH 8.0~9.5, pH 6.0~8.0 (Pharmacia) を各々 8:1:1 の割合で混合したものを用い、Solution A (50 % sucrose 62.56 ml + Ampholine 溶液 2.44 ml)、solution B (蒸留水 64.2 ml + Ampholine 溶液 0.8 ml) を調製した。Solution A, B 両者を混合して 0~50 % の 25 段階の濃度の sucrose 溶液を 5 ml ずつ調製した。これらの sucrose 溶液を内径 1.5 × 30 cm の冷却装置付き等電点電気泳動カラム内にペリスタポンプを用いて重層し sucrose の密度勾配を作製した。120 IU の h-P A を泳動カラム中央部 (sucrose 濃度 26 %) に加注し、陽極側に 1 % リン酸含有 50 % sucrose 溶液、陰極側に 1 % EDTA 溶液を重層した。

泳動は 4 °C で行い、200 V, 1 時間の予備通電後、900 V まで徐々に昇電圧し、900 V で 48 時間泳動した。泳動後泳動カラム内の溶液を 1 ml ずつ分取し、pH および紫外部 (280 nm) 吸収を測定した。さらに酸性の pH を示した画分については Tris 2 mg を加え、pH を調整後 fibrin plate に spot し h-P A 活性を測定した。

【結果】

① 初代培養肝細胞培養液中からの h-P A の精製

1) CM-Sepharose CL-6B (Batch 法) による h-P A の精製

初代培養肝細胞培養上清を、流水中で解凍後、8,000 rpm, 10 min (4 °C) 遠心分離し、寒冷不溶性グロブリン等の不溶物を除去した。培養液の pH は酢酸を用いて 4.5 に調整し、0.01 % Tween 80, 0.1 M NaCl 含有 0.05 M acetate buffer (pH 5.0) 中に懸濁した CM-Sepharose CL-6B (Pharmacia) を培養液 100 ml に対して 7 ml の割合で添加し、12 hr, 4 °C で攪拌し、h-P A を吸

着させた。吸着後、ゲルはガラスフィルター (G3) 上で 同 acetate buffer (4 °C) を用いて非吸着物を充分洗浄、除去した後、8.3 × 30.5 cm のカラムに充填した。

吸着画分は 0.01 % Tween 80, 0.1 M NaCl 含有 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 を用いて 1 ml/min の流速で溶出し、6 ml ずつ分画した。

Fig. 2-3 は CM-Sepharose gel からの h-P A の溶出クロマトグラムを示したが、タンパクの peak と fibrin plate 法により測定した活性 peak はほぼ一致していた。

図中に示すように pool した h-P A 画分の総タンパク量は 56 mg で、培養液中の総タンパク量 249 mg に比較すると約 1/5 に減少したが、総活性は逆に 7280 IU から 7890 IU へ増大し、回収率は見かけ上 100 % を上回る結果となった (Table 2-2)。h-P A 精製の出発材料として用いた培養液は、培養中に産生された h-P A の低分子化を防止するために、予め終濃度 2 IU/ml の aprotinin を添加した培養液で培養を行っている。CM-Sepharose chromatography により、h-P A 活性画分から弱い P A 活性阻害作用を示す aprotinin が除去されたため、総活性量は出発材料である medium 中のそれを上回ったものと考えられる。以後、この CM-Sepharose 活性画分の総活性量を 100 % とし、回収率の計算を行った。

2) Arginine-Sepharose column chromatography

CM-Sepharose より得られた h-P A 活性画分は、0.01 % Tween 80, 0.15 M NaCl 含有 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 で平衡化した Arginine-Sepharose 4B column (2.6 × 40 cm) に供し、同 Tris-HCl buffer で非吸着画分を充分洗浄、溶出後、0.5 M Arginine 含有同 Tris-HCl buffer で吸着画分を溶出し、7.5 ml ずつ分取した (Fig. 2-4)。

0.5 M Arginine により溶出された h-P A 活性画分は 0.01 % Tween 80 含

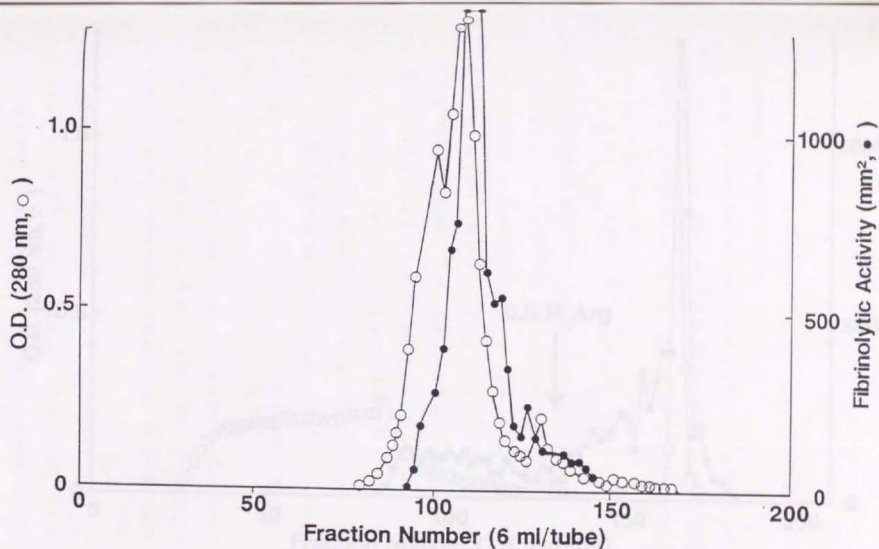


Fig. 2-3. Elution profile of h-PA from CM-Sepharose CL-6B. The h-PA in the conditioned medium was adsorbed to CM-Sepharose CL-6B at pH 4.5 by the "batch method". After the adsorption, the gel was washed well with 0.05 M acetate buffer, pH 4.5. Then, the adsorbed fraction was eluted with 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0.

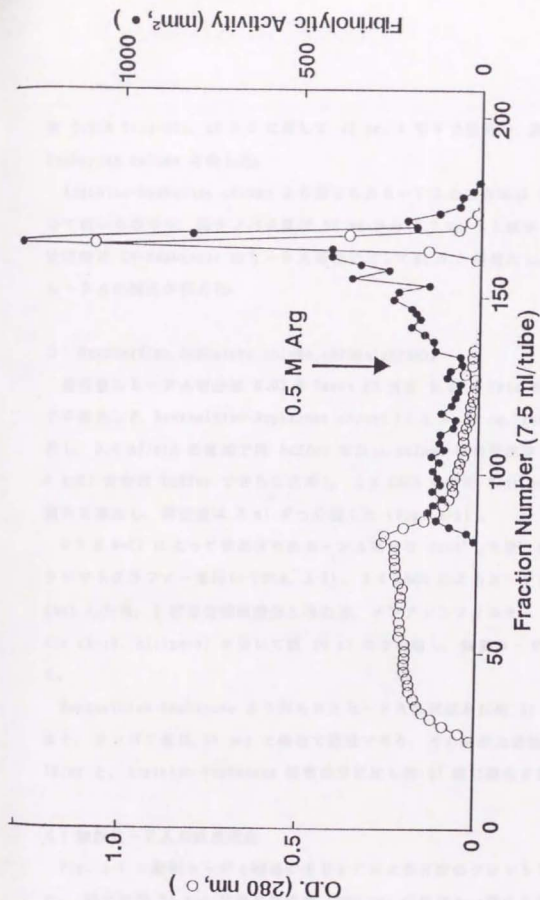


Fig. 2-4. Affinity chromatography of h-PA on Arginine-Sepharose 4B. The partial purified h-PA obtained from a cation exchanger was applied on the Arginine-Sepharose column equilibrated with 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0. The h-PA adsorbed was eluted with 0.5 M Arginine.

有 0.05M Tris-HCl, pH 8.0 に対して 12 hr, 4 °C 下で透析し, Benzamidine-Sepharose column に供した。

Arginine-Sepharose column より得られた h-P A の回収率は 88.4 % と極めて高いもので、総タンパク量が 56 mg から 7.7 mg へと減少したことから、比活性は CM-Sepharose の h-P A 画分に比して約 6.5 倍増大し、効率よく h-P A の純化が行えた。

3) Benzamidine-Sepharose column chromatography

透析後の h-P A 画分は 0.01 % Tween 80 含有 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 で平衡化した Benzamidine-Sepharose column (1.0 × 28 cm, Pharmacia) に供し、0.5 ml/min の流速で同 buffer を用い column を充分洗浄した後、0.2 M NaCl 含有同 buffer でさらに洗浄し、2 M KSCN 含有同 Tris buffer で吸着画分を溶出し、溶出液は 2 ml ずつ分画した (Fig. 2-5)。

0.2 M NaCl によって溶出された h-P A 画分を pool した後、同条件下でリクロマトグラフィーを行い (Fig. 2-6)、2 M KSCN による h-P A 溶出画分は、pool した後、1 回目の溶出画分と合わせ、メンブレンフィルター (Immersible CX-10, Milipore) を用いて約 20 ml まで濃縮し、精製 h-P A 標品とした。

Benzamidine-Sepharose より得られた h-P A の回収率は約 21 % であった。また、タンパク量は 35 μ g と極めて微量であり、その結果比活性は 42,800 IU/mg と、Arginine-Sepharose 活性画分に比し約 47 倍に純化された。

4) 精製 h-P A の純度検定

Fig. 2-7 に精製 h-P A 標品の FPLC による分析のクロマトグラムを示した。溶出時間 33 min 前後に紫外部 (280 nm) の吸収と一致する単一な活性 peak が観察され、h-P A が高度に精製されていることが明らかとなった。

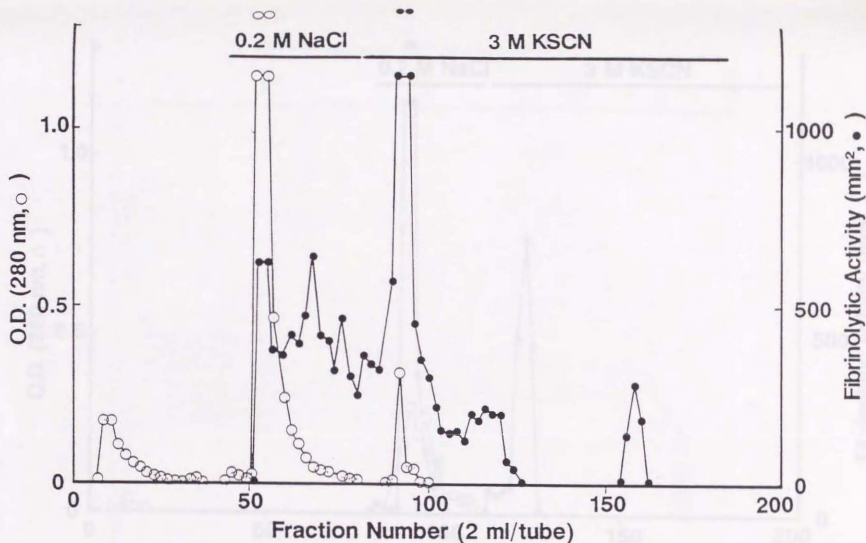


Fig. 2-5. Affinity chromatography of h-PA on Benzamidine-Sepharose CL-6B.

The h-PA purified by affinity chromatography on Arginine-Sepharose was challenged to Benzamidine-Sepharose column. The column was washed with Tris-HCl buffer and the buffer containing 0.2 M NaCl. Then, the retained h-PA was eluted with 3 M KSCN.

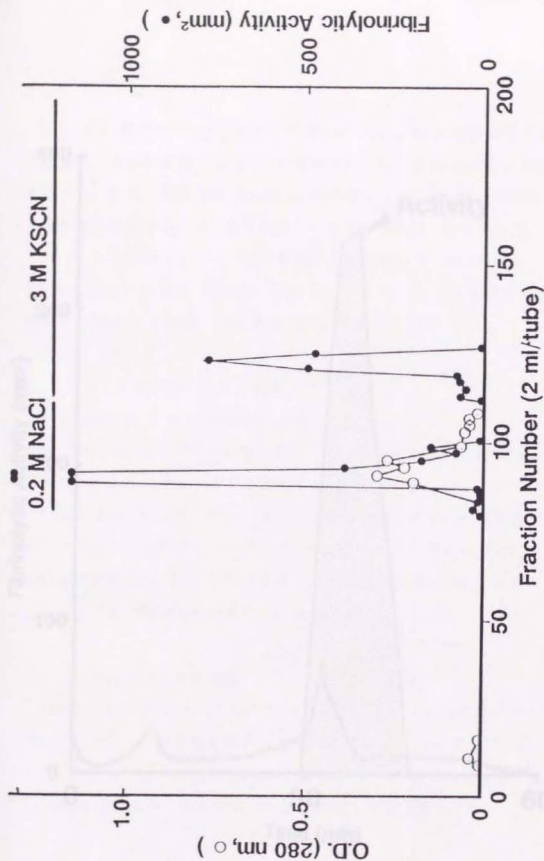


Fig. 2-6. Rechromatography of h-PA on Benzamidine-Sepharose column. The h-PA eluted from Benzamidine-Sepharose with 0.2 M NaCl, was applied again to the same column and eluted by the same manner as shown in the Fig. 2-5.

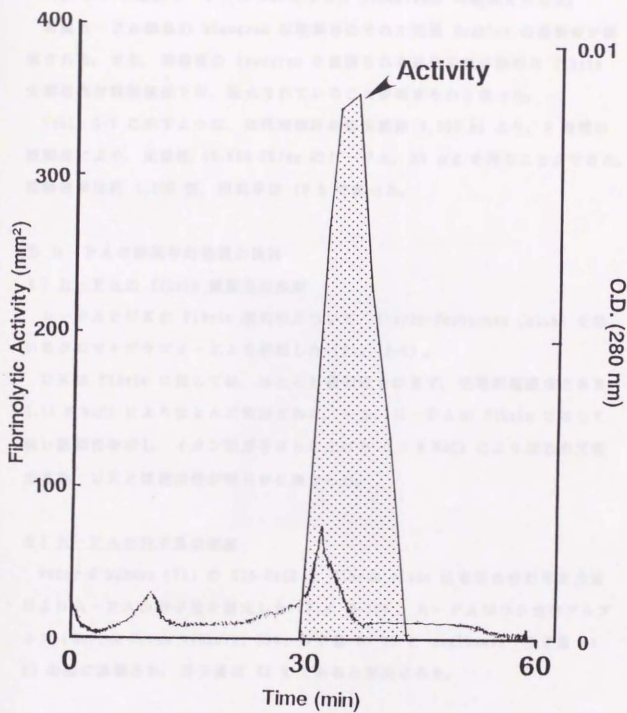


Fig. 2-7. Chromatography of purified h-PA on Superose 12 (FPLC).

Fig. 2-8 に精製 h-PA について行った zymography の結果を示した。

精製 h-PA 標品の zymogram は培養液のそれと同様 doublet の溶解窓が観察される。また、培養液の zymogram に観察される高分子量の微弱な fibrin 分解活性が精製標品では、除去されていることが明らかとなった。

Table 2-2 に示すように、初代培養肝細胞培養液 5,200 ml より、3 段階の精製法により、比活性 42,800 IU/mg の h-PA、35 μ g を得ることができた。精製倍率は約 1,500 倍、回収率は 19 % であった。

② h-PA の酵素学的性質の検討

1) h-PA の fibrin 親和性の検討

h-PA と UK の fibrin 親和性について、fibrin-Sepharose column を用いたクロマトグラフィーにより検討した (Fig. 2-9)。

UK は fibrin に対しては、ほとんど親和性を示さず、生理的塩濃度である 0.15 M NaCl によりほとんど溶出された。一方、h-PA は fibrin に対して強い親和性を示し、イオン強度をさらに上げた 0.5 M NaCl によりはじめて溶出され、UK とは溶出性が明らかに異なった。

2) h-PA の分子量の測定

Weber & Osborn (75) の SDS-PAGE と fibrin plate 法を組み合わせた方法により h-PA の分子量を測定した (Fig. 2-10)。h-PA はウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin, BSA, 分子量 67 k) と ovalbumin (分子量 43 k) の間に泳動され、分子量は 62 k であると算出された。

3) h-PA の plasminogen 活性化能の検討

Fig. 2-11 に h-PA と UK の活性を standard fibrin plate 法により比較測定した結果を示す。h-PA、UK とも濃度依存的に fibrin を分解し、両

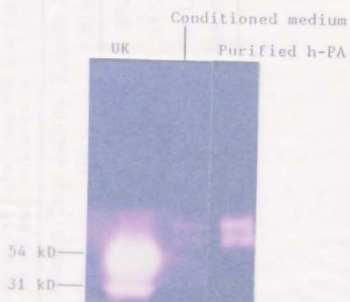


Fig. 2-8. Zymography of h-PA.

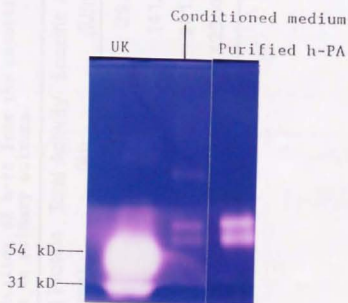


Fig. 2-8. Zymography of h-PA.

Table 2-2. Purification of h-PA from the conditioned medium of rat hepatocytes in primary culture.

Step	Volume (ml)	Total Protein (mg)	Total Activity (IU)	Specific Activity (IU/mg)	Purification Fold	Recovery (%)
Medium	5200	249.1	7280	29.2	1	
CM-Seph.	1400	56.0	7890	141.0	4.8	100
Arg-Seph.	140	7.73	6971	901.8	30.9	88.4
Benz-Seph.	18	0.035	1498	42800	1465.7	19.0

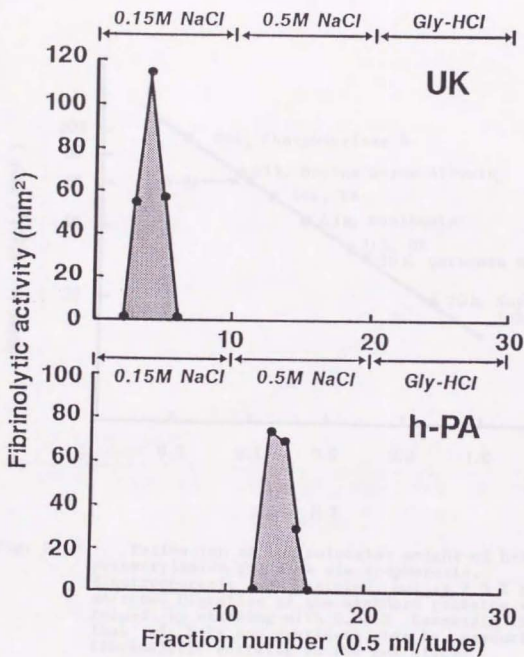


Fig. 2-9. The affinity of UK and h-PA to Fibrin-Sepharose 4B.

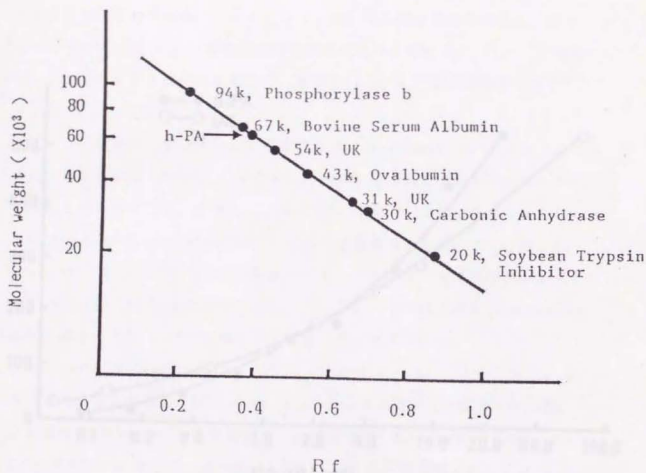


Fig. 2-10. Estimation of the molecular weight of h-PA by SDS-polyacrylamide gel disk electrophoresis. Electrophoresis was carried out in 7.5 % gel at 8 mA/tube. Migration of the standard proteins were determined by staining with 0.02 % Coomassie Blue, and that of h-PA and urokinase were by measuring their fibrinolytic activity in the gel slices.

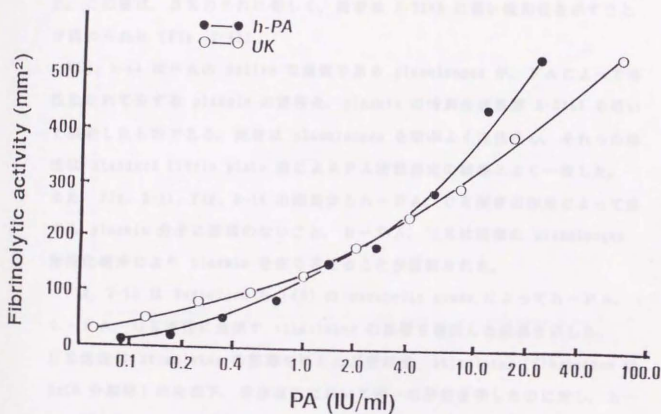


Fig. 2-11. Concentration/activity curves for h-PA and UK. The h-PA was serially diluted and the fibrinolytic activity curve for h-PA was drawn to intersect at 150 mm² (1.4 IU/ml) on the curve obtained from UK, which was drawn using standard known units.

者ともに同様の plasminogen 活性化能を示した。

Fig. 2-12 は h-P A の組織 P A 特異合成基質 S-2288 の分解能を検討した結果を示したものである。h-P A は S-2288 を濃度依存的に分解し、Lineweaver-Burk plot により求めた同基質に対する K_m 値は $4.3 \times 10^{-4} M$ であった。この値は、B K のそれに等しく、両者は S-2288 に強い親和性を示すことが認められた (Fig. 2-13)。

Fig. 2-14 は P A の native な基質である plasminogen が、P A によって活性化されて生ずる plasmin の活性を、plasmin の特異合成基質 S-2251 を用いて測定したものである。両者は plasminogen を効率よく活性化し、それらの活性は standard fibrin plate 法による P A 活性測定の結果とよく一致した。また、Fig. 2-11, Fig. 2-14 の結果から h-P A、U K 両者の作用によって生ずる plasmin 分子に差異のないこと、h-P A、U K は同様の plasminogen 活性化機序により plasmin を生じさせることが推察された。

Fig. 2-15 は Verheijen ら (46) の parabolic assay によって h-P A、t-P A、U K 活性に及ぼす stimulator の影響を検討した結果を示した。U K 活性は stimulator の影響をほとんど受けず、stimulator (fibrinogen の BrCN 分解物) の存在下、非存在下において同一の活性を示したのに対し、h-P A 活性は t-P A と同様に stimulator の存在によって顕著に増大した。

4) h-P A の至適 pH 及び pH 安定性

h-P A の至適 pH は S-2288 を用いて検討した結果、pH 8.0 付近であることが確認された (Fig. 2-16)。また、h-P A の pH 安定性については 60 °C, 60 min の温度負荷をかけた状態で測定したところ pH 7.0 の中性付近で安定であり、アルカリ側の pH では比較的安定であることが認められた。酸性側 pH では h-P A 活性は急速に減少し、特に pH 5.0 以下では不安定であった (Fig. 2-17)。

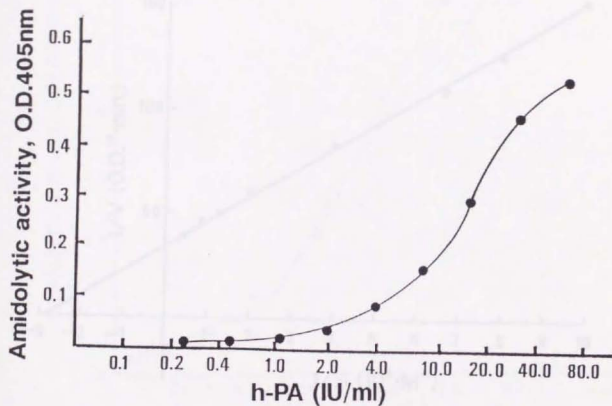


Fig. 2-12. Concentration/activity curve for h-PA.
The activity was measured directly by using a synthetic peptide substrate, S-2288.

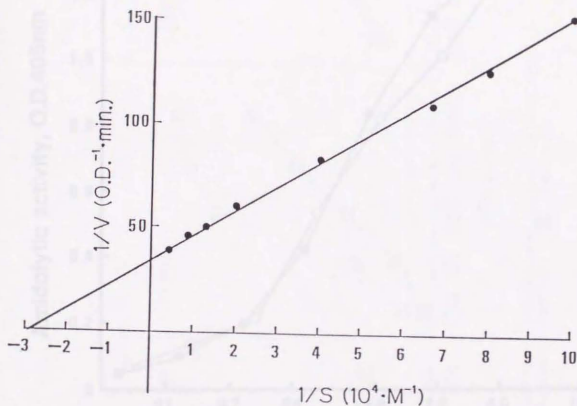


Fig. 2-13. Lineweaver-Burk plots for h-PA.

The plots were obtained by using a synthetic peptide substrate, S-2288. The substrate-Tris buffered saline solution (pH 8.4) was combined with activator, and the chromogene (pNA) released at 37°C was measured at 405 nm. The K_m value was calculated to be $0.36 \times 10^{-4} \text{ M}$.

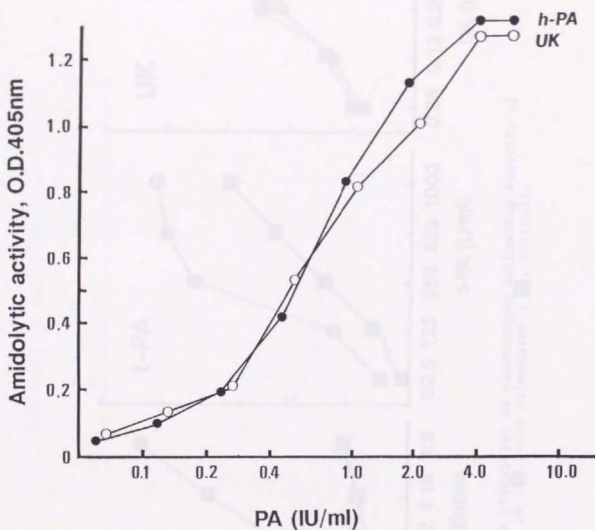


Fig. 2-14. Concentration/activity curves for h-PA and UK.
The activity was measured by using a synthetic peptide substrate, S-2251, in the presence of human plasminogen.

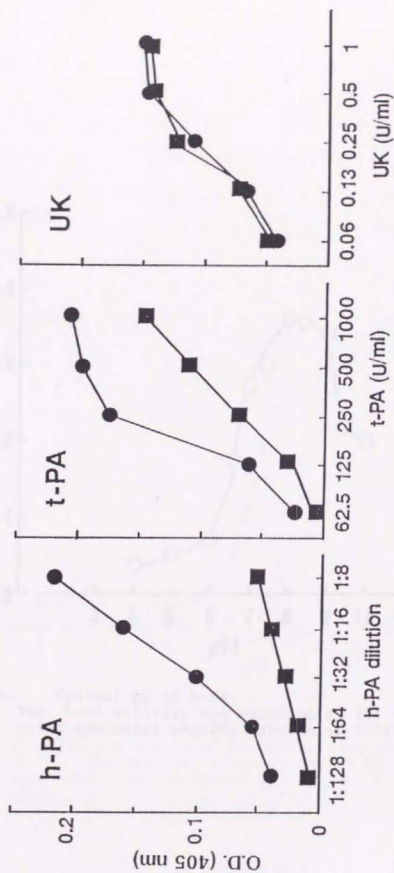


Fig. 2-15. Effect of the stimulator on plasminogen activating activity of h-PA, t-PA and UK (●, with stimulator; ■, control).

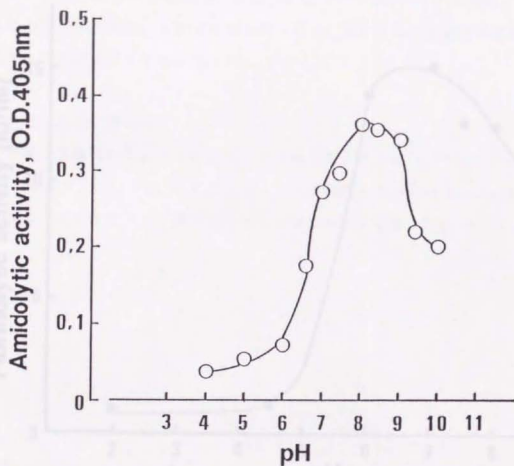


Fig. 2-16. Optimal pH of h-PA.

The h-PA activity was measured at the various pH by using synthetic peptide substrate, S-2288.

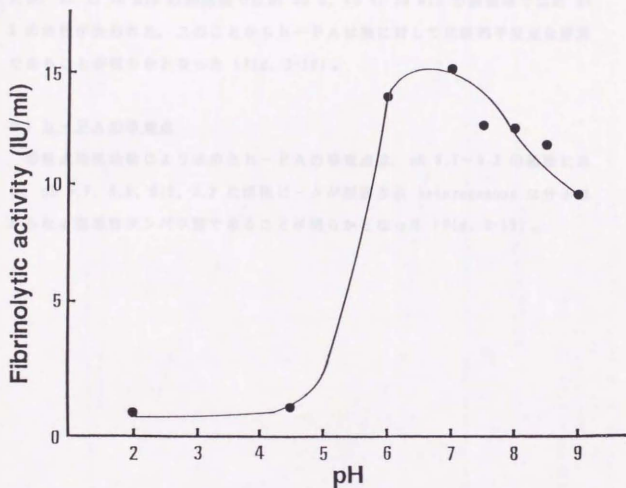


Fig. 2-17. pH-stability of h-PA.
The h-PA was incubated at the various pH for 60 min at 60°C. The activity remained in the course of incubation was then measured by using a standard fibrin plate.

5) h-PAの熱安定性の検討

h-PAの 0 °C, 37 °C の処理は h-PA 活性にほとんど影響を与えなかったが、60 °C 30 min の熱処理では約 60 %, 80 °C 30 min の熱処理では約 87 % の活性が失われた。このことから h-PA は熱に対して比較的不安定な酵素であることが明らかとなった (Fig. 2-18)。

6) h-PA の等電点

等電点電気泳動により求めた h-PA の等電点は、pH 8.7~9.2 の範囲にあり、pH 8.7, 8.9, 9.0, 9.2 に活性ピークが観察され heterogenous な分子種からなる塩基性タンパク質であることが明らかとなった (Fig. 2-19)。

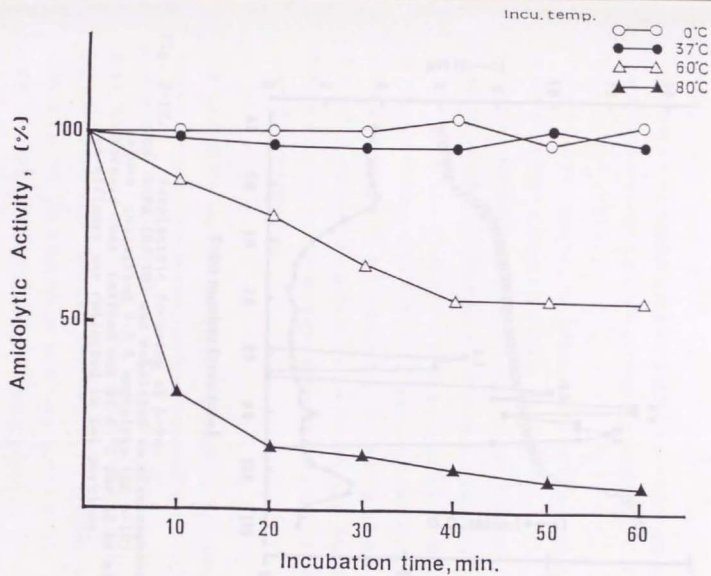


Fig. 2-18. Thermostability of h-PA. The h-PA was incubated in 50 mM Tris-HCl, pH 8.4, at the various temperatures for up to 60 min. Remained activity was then measured directly by a synthetic peptide substrate, S-2288 at 37°C.

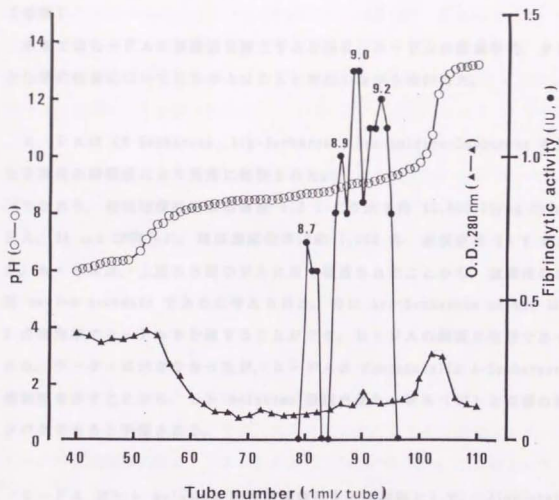


Fig. 2-19. Isoelectric focusing of h-PA. The h-PA (63 IU) was submitted to electrophoresis in a column containing 0.5 % ampholyte (pH 6-10). Electrophoresis was carried out at 4 °C for 48 hr at 900 V. The effluent was collected in 1ml portions.

【考察】

本章ではh-P Aの精製法を確立すると共に、h-P Aの酵素学的、タンパク化学的性質についてU KおよびB Kと対比しながら検討した。

h-P AはCM-Sepharose, Arg-Sepharose, Benzamidine-Sepharoseを用いた3段階の精製法により高度に精製された。

すなわち、初代培養肝細胞培養液 5.2 l より比活性 42,800 IU/mg のh-P A、35 μ g が得られ、精製濃縮倍率は約 1,500 倍、回収率は 19 % であった。h-P Aは、上記の3種のゲルに良く吸着されたことから、塩基性の活性型 serine protease であると考えられた。特に Arg-Sepharose column は 88 % の回収率でh-P Aを分離することができ、h-P Aの精製に有効であった。また、データーは示さなかったが、h-P Aは Concanavalin A-Sepharose に親和性を示すことから、ヒト melanoma 細胞由来 t-P A (47) と同様の糖タンパクであると予想される。

t-P A はヒト melanoma 細胞培養液等を出発材料として、Zinc-chelate agarose, Concanavalin A-agarose, Arginine-Sepharose, Fibrin-celite, p-aminobenzamidine-Sepharose, ゲル濾過、抗体カラムを用いた方法により精製されている(47, 48, 49, 50, 51, 52)。特にマイクロキャリアを用いた工業的規模での精製法では、Sephadex G-50, Zinc-chelate Separose, Sephadex G-100 を用い 750 l の培養液から 67 mg のt-P Aが得られ、40 l のスケールでは 4 mg のt-P Aが得られたという報告がある(53)。

さらに、anti-t-PA monoclonal antibody を結合させた IgG-Sepharose, Lysine-Sepharose, Sephadex G-150 を用いた精製法によりt-P Aを得たという報告や(54)、Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞培養液から、monoclonal antibody column により single step でt-P Aを精製できたという報告もあ

る (55)。一方、Kacianらは Rous Sarcoma Virus (RSV) を感染させて、 t -PA 産生能を増大させた鶏胎児線維芽細胞培養液より fibrin-celite, p-aminobenzamidine agarose column, ゲル濾過により、高収率で t -PA が精製できたと報告している (56)。

精製 h -PA 標品の FPLC によるゲル濾過カラム (Superose 12) によって得られた chromatogram は h -PA 活性 peak とタンパク peak との溶出位置が一致し、他の不純物の peak が認められなかったことから、本精製法によって得られる h -PA は高度に精製されているものと考えられた。また、精製 h -PA の分子量は SDS-PAGE, および zymography による検討から、約 60 k であると算出され、胆汁中の PA である BK の分子量 (24) と近似していた。

本研究において、初代培養肝細胞培養液より精製した h -PA タンパクの本体は、高感度染色法である銀染色法によっても電気泳動的に観察することはできなかった。 t -PA について述べたように企業的な大規模精製法によって得られた高度精製標品の t -PA は比活性約 $\sim 500,000$ IU/mg と高値であることから、 h -PA のタンパク質としての本体を通常の染色法で観察するためには、より多量の標品を得ることが必要であると考えられる。そのためには、さらに多量の培養液を精製材料として用いるか、初代培養肝細胞における h -PA の高産生条件の検討等を行う必要があろう。

続いて精製 h -PA の酵素学的、タンパク化学的性質を検討した。

まず h -PA の fibrin 親和性を fibrin-Sepharose を用いて UK のそれと比較したところ、UK は生理的塩濃度である 0.15 M NaCl により完全に溶出され fibrin に対してほとんど親和性を示さなかったが、 h -PA はイオン強度をさらに上げた 0.5 M NaCl によりはじめて溶出され、 t -PA 同様 fibrin に対して強い親和性を示した。このことは、 h -PA が UK とは異なり、 t -PA

類似の plasminogen activator であることを示唆している。

h-PA の基質特異性並びに plasminogen 活性化能について種々の基質を用いて検討したところ、h-PA は UK 特異合成基質である S-2444 はほとんど分解しなかったが、組織 PA 特異合成基質 S-2288 をよく分解し、その K_m 値は $0.36 \times 10^{-4} M$ と算出された。この値は BK やブタ心臓 t-PA の示す値と近似することが明らかになった (Table 2-2)。

Table 2-2. Comparison of K_m values for the substrate S-2288 among h-PA, bilokinase and porcine heart t-PA.

Enzyme	K_m value (M)
h-PA	$0.36 \times 10^{-4} M$
Bilokinase	$0.43 \times 10^{-4} M$
t-PA, one chain ^{a)}	$1.0 \times 10^{-3} M$
t-PA, two chain ^{a)}	$0.3 \times 10^{-3} M$

a) The data given by KABI DIAGNOSTICA.

h-PA 活性については UK 活性との比較を standard fibrin plate 法、parabolic assay 法により行ったが、これら 2 種の測定法において、h-PA、UK の両者はほぼ同一な dose-response curve を示した。このことから、h-

PAとUKの plasminogen 活性化能には差異はないものと考えられた。

t-PAとUKは同一な基質特異性を示し、両者は plasminogen 分子内の同一のペプチド結合 ($\text{Arg}^{562}-\text{Val}^{561}$) を加水分解することにより plasmin へ変換する。しかしながら、fibrinogen の臭化シアン (BrCN) 分解物である stimulator の存在下ではt-PAとUKの活性は大きく異なることが知られている (46)。今回、stimulator を添加した parabolic assay 系では、h-PA活性は顕著に増大し組織型PA特有の性質を示した。

今回得られた初代培養肝細胞が産生するh-PAの性質を Table 2-3 に要約した。

Table 2-3. Physicochemical and Enzymatic Characteristics of h-PA.

<u>Physicochemical</u>	<u>Enzymatic</u>
Molecular Weight ~ 60 k (SDS-PAGE)	Optimal pH pH = 8.0 (S-2288)
Isoelectric point pH = 8.7, 8.9, 9.0, 9.2 (Isoelectrofocusing)	Thermostability Stable at 37 °C Labile at 80 °C
	Hydrolysis : S-2288 $K_m = 0.36 \times 10^{-4} M$
	Fibrin affinity High

以上の結果から初代培養肝細胞が、UKとは異なる組織型PA (tissue type PA ; t-PA) を産生していることが明らかとなった。

PAの化学的・物理化学的性質についての報告は少ない。

Wu ら (52) は、ヒト肺癌細胞 Mia Pa Ca-2, ラット肺癌細胞 R2426 由来 PA、および UK の性質について検討し、この 3 種の PA 活性は 70 °C, 30 min の熱処理によりそれぞれ 71 %, 80 %, 79 %, 80 °C, 5 min では 95 %, 96 %, 94 % の活性が失われ、これらの温度では比較的不安定であったと報告している。また、これらの PA の pH 安定性については、pH 1.5~10.0 では安定であったが、pH 11.0 では 85~90 % の活性が失われ、pH 12.0 ではほぼ完全に失活したという。ここで著者が検討した h-PA は、60 °C 30 min の熱処理で約 60 %, 80 °C 30 min の熱処理では約 87 % の活性が失われたことから、これらの PA と同様に熱には不安定な酵素であることが明らかとなった。また、h-PA の至適 pH は 8.0, pH 安定性は 7.0 で最大で、熱安定性同様 Mia Pa Ca-2, R2426, UK 等と同様の性質を示した。

h-PA は pH 8.7, 8.9, 9.0, 9.2 に等電点を示す heterogenous な塩基性タンパク集合体であることが明らかとなったが、これらは、すでに UK (57) や BK (24) について報告されている現象とよく似ている。Heterogenous な分子種は、これらの PA について予想されているように、おそらく糖鎖の数や鎖長による違いを反映しているものと考えられる。

第3章 初代培養肝細胞が産生する線溶活性化酵素 (h-PA)

の免疫学的性質

【緒言】

前章までに初代培養肝細胞が産生するPA、h-PAについて細胞レベルでその存在を明らかにすると共に、培養液中に分泌されたh-PAの精製を行い、h-PAの酵素学的、タンパク化学的性質を検討した。

本章では、抗ラットh-PA抗体の作製を行うと共に、種々のラット組織より抽出したPA、BK、尿中PAに対する抗h-PA抗体の免疫学的反応性を検討して、h-PAと種々のPAとの免疫学的異同及びその性質の解析を試みた。

【方法】

① 抗ラットh-PA抗体の作製

初代培養肝細胞培養液より SP-Sephadex によるイオン交換クロマトグラフィー、Fibrin-Sepharose によるアフィニティークロマトグラフィーで得た標品を更に Mono S column を用いたFPLCにより精製したh-PA (58) を抗原として、家兎 (New Zealand White, male, 2.5 kg) にアジュバント免疫した。すなわち比活性 500 IU/mg のh-PAを抗原として Freund's の complete adjuvant (ナカライテスク、初回免疫～第6回免疫) または incomplete adjuvant (ナカライテスク、第7回免疫～最終免疫) と共に2週間に1度、6ヶ月にわたり総量 13,000 IU を背部の皮下及び皮内に免疫した。

最終免疫後 10 日目に、耳静脈より採血した血液は、ガラス製試験管に分注し 4℃、一夜放置後、抗血清を採取した。抗h-PA抗血清は 0.15 M NaCl,

0.01 % メルカプトナトリウム 含有 0.05 M Phosphate buffer, pH 8.0 に対して 4 °C、12 hr 透析後、同 buffer で平衡化した DEAE-Sepharose CL-6B (1.5 × 25cm) に apply し非吸着画分を分画した。得られた非吸着画分は同 buffer で平衡化した Protein A-Cellulofine column (1.0 × 4 cm, 生化学工業) に apply し、非吸着画分を充分洗浄溶出後、吸着された IgG を 0.2 M Glycine-HCl, pH 3.0 で溶出した。溶出された IgG は直ちに 0.15 M NaCl, 0.01 % メルカプトナトリウム 含有 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 に対して 4 °C、12 hr 透析した。

透析後 0.1 % になるようにウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) を加え、抗 h-P A 抗体とした。抗体価の測定は、一定単位の h-P A 及び urokinase に種々の濃度の抗 h-P A 抗体あるいは control 抗体を加え、4 °C、12 hr 抗原抗体反応させ、残存活性を既述の standard fibrin plate 法 (第 1 章 方法③) により測定した。

② ラット組織 P A の抽出及び分画

体重 250 g 前後の Wistar 系ラット 15 匹より心臓、腎臓、肺臓、子宮、卵巣を摘出した。これらの臓器からの P A の抽出は Sueishi ら (48) の方法を改良した方法により行った (Fig. 3-1)。

すなわち、摘出した臓器は水冷生理食塩水中で血液、脂肪、結合組織等を除去し充分洗浄後実験に用いた。以下の操作はすべて氷冷下、もしくは 4 °C 低温室で行った。洗浄後各臓器は眼科ハサミで細切し、ポリトンホモジナイザーで homogenize した。Homogenate は 20 倍量の冷 acetone (-20 °C) で脱脂質し、さらに、等量の冷 acetone による抽出を 3 回行った後、真空乾燥し acetone powder を得た。

Acetone powder からの P A の抽出は 2 M NH₄SCN により行った。Acetone powder 1 g に対して 10 ml の 2 M NH₄SCN 含有 0.02 M Tris-HCl, pH 7.4 を加え、12 hr 攪拌、抽出した。抽出後 10,000 rpm, 30 min 遠心分離し、残渣

Tissues (heart, lung, kidney, uterus, ovary)

—homogenize

—delipidate with -15°C acetone

Delipidated powder

—suspend in $2\text{M NH}_4\text{SCN}$ (pH 7.4)

—stir overnight

—13,000 X g, 30min.

ppt

sup

—acidification (pH 3.0)

ppt

sup

— $2\text{M NH}_4\text{SCN}$ (pH 7.4)

Plasminogen activator

Fig. 3-1. Extraction of plasminogen activator from various tissues.

を同様に同量の 2 M NH_4SCN (pH 7.4) を加え、4 hr 再抽出した。両抽出液を合わせ、1 N HCl を用いて pH を 3.0 に調整し、PA 活性画分を沈澱として得た。沈澱は 20 ml の 2 M NH_4SCN (pH 7.4) を加えて溶解し、7 M NH_4OH で pH を 7.4 に調整して、4 hr 抽出した。抽出後 0.1 % Triton X-100, 5 mM NaCl 含有 0.02 M Tris-HCl , pH 8.0 に対して 12 hr 透析し、組織 PA とした。但し、心臓 PA に関しては、透析により PA 活性が溶液中に回収できなかったため、2 M NH_4SCN 溶液をそのまま活性測定に用いた。

③ ラット胆汁の採取と B K の抽出

体重 200 g 前後の Wistar 系雄ラットをエーテル麻酔下で開腹し、総胆管にカニューレーションを行った。総胆管カニューレ装着後、腹部を縫合しラット固定器で固定した。胆汁は 10,000 IU/ml aprotinin, 0.1 ml を含む試験管（水中に保持）中に採取した。

このようにして得た胆汁からの B K の調製は既報の A-A 法 (24) により行った。

④ ラット尿の採取と U K の調製

ラット尿は Wistar 系雄ラット膀胱より 1 ml 容シリンジを用いた膀胱尖刺により採取した。採取尿は 3,000 rpm, 15 min 遠心分離後、0.15 M NaCl , 0.01 % Tween 80 含有 0.05 M Tris-HCl , pH 8.0 で平衡化した Sephadex G-100 column (1.5 × 90 cm) に供した。溶出液は 1 ml ずつ分取し、それぞれの PA 活性を plasminogen-rich fibrin plate および plasminogen-free fibrin plate を用いて測定した。U K 活性画分を pool し、stabilizer として BSA を 0.1 % になるように添加し、使用時まで -80 °C で保存した。

⑤ ラットPAの分子種の検討

ラットPAの分子種は既述の zymography により検討した(第1章 方法⑤)。

⑥ 抗ラットh-PA抗体とラットPAの反応性の検討

抗ラットh-PA抗体と各種ラットPAの反応性はPA活性のクエンチング(quenching)により検討した。すなわち 0.2 IU/ml のラットPAと等量の種々の濃度の抗ラットh-PA抗体を 4 °C, 12 hr 抗原抗体反応させ、残存活性を ^{125}I -fibrin plate 法により測定した。 ^{125}I -fibrin plate 法は standard fibrin plate 法に比し多検体のPA活性を短時間で測定することが可能である。

^{125}I -fibrinogenは McFarlaneら(59)の方法により調製し、96-well micro assay plate (442404, NUNC) に12,000~15,000 cpm/well の割合で吸着させ、常法により 1 % BSA 溶液で free space をマスクした。吸着させた ^{125}I -fibrinogen は 0.2 U thrombin (持田製薬)を用いて fibrin に変換させ、0.05 % Tween 20 含有 phosphate buffer saline, pH 7.4 (PBS) で洗浄後測定に用いた。

^{125}I -fibrin plate 法で用いた human plasminogen は、ヒト健常者血漿より Lys-Sepharose column を用いた affinity chromatography により粗精製したものをを用いた。すなわち、0.38 % sodium citrate 加血より調製した血漿を borate buffer (0.04 M NaCl 含有 0.16 M borate buffer, pH 7.8) で平衡化した Lys-Sepharose column に供し非吸着画分を充分洗浄除去後 2 % acetate で溶出した。得られた plasminogen 画分は Tris, NaOH を用いて pH 8.0 に調整後 -80 °C で貯蔵し、使用時に borate buffer で希釈した。

PA 活性の測定は、50 μl の plasminogen 溶液 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と 100 μl の sample を well 中で混合し、37 °C、3 hr incubateした後、反応溶液 100 μl についての放射活性を測定することにより行った。h-PA 活性単位は human urokinase (UK、ミドリ十字)を用いて作製した standard curve より UK 単

位数に換算して求めた。

【結果】

① 抗 h-P A 抗体の性質

抗ラット h-P A 抗体（以下抗 h-P A 抗体と略称する）がラット h-P A、B K、U K および ヒト U K 活性に及ぼす影響を Fig. 3-2 に示した。

抗 h-P A 抗体は h-P A、B K に対し、これらの活性を共に濃度依存的に阻害し、0.1 $\mu\text{g/ml}$ ないし 1 $\mu\text{g/ml}$ の低濃度の抗体によって両活性は完全に阻害された。

一方、抗 h-P A 抗体はラット U K および ヒト U K に対しては抗体濃度に関わらず何等影響を及ぼさなかった。このことから抗 h-P A 抗体は h-P A、B K と特異的に反応し、ラット U K や ヒト U K とは cross-reactivity を示さない抗体であることが明らかとなった。

② ラット組織 P A の性質

ラット組織より NH_4SCN 抽出法により得られた P A の fibrin plate 法による活性測定の結果を Fig. 3-3 に示した。心臓、腎臓、肺臓、子宮、卵巣より得られた P A は plasminogen-rich fibrin plate 上でのみ溶解性を形成し、plasminogen-free fibrin plate 上では何等 fibrin 分解活性を示さなかった。このことから、各臓器から P A が抽出されていることが明らかとなった。

また、Table 3-1 はラット 15 匹の各組織より得られた抽出液の総 P A 活性、タンパク質量、並びに比活性を示したものである。P A 活性は卵巣で最も高く（3.34 IU/mg）、肺（1.2 IU/mg）や子宮（0.8 IU/mg）でも高い活性が検出された。

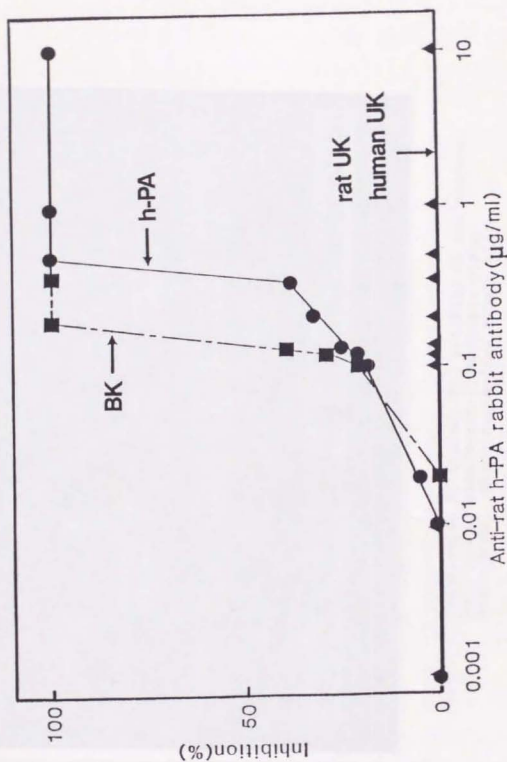


Fig. 3-2. Quenching of the activities of h-PA and BK by anti-rat h-PA rabbit antibody.

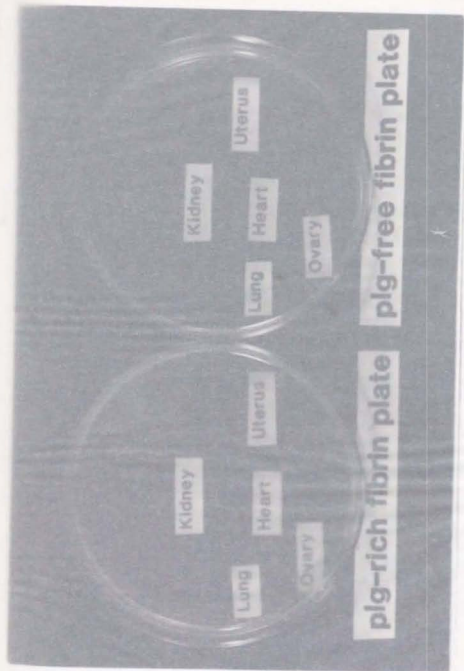


Fig. 3-3. Plasminogen Activator (PA) activity of rat tissues.
 Left panel, plasminogen-rich fibrin plate.
 Right panel, plasminogen-free fibrin plate.



Fig. 3-3. Plasminogen Activator (PA) activity of rat tissues.
 Left panel, plasminogen-rich fibrin plate.
 Right panel, plasminogen-free fibrin plate.

Table 3-1. Plasminogen activators in rat tissues

Tissue	Total activity (IU)	Total protein (mg)	Specific activity (IU/mg)
Heart	29.0	450.0	0.03
Lung	48.0	510.0	1.20
Kidney	73.0	675.0	0.30
Ovary	17.6	67.5	3.34
Uterus	16.0	104.0	0.80

これらのラットPAの zymogram を Fig. 3-4 に示した。h-PA は分子量約 60 k の位置に溶解窓を示したが、BK や心臓、腎臓、肺臓、子宮、卵巣より得られたPA もほぼ同一の分子量 60 k の位置に溶解窓を示し、これらのPA は比較的均一な分子種として存在することが明らかとなった。

一方、ラット尿中よりゲル濾過により分画したUK は分子量 38 k の位置に泳動され、h-PA、BK、組織PA とは明らかに異なった。

③ h-PA およびラットPA の免疫学的性質

h-PA と組織PA、UK、BK の免疫学的異同について抗h-PA 抗体を用いて検討した。Fig. 3-5 に 5 μ g/ml の抗h-PA 抗体によるPA 活性の quenching の結果を示した。

抗h-PA 抗体はh-PA 活性同様BK 活性を完全に阻害した。また、組織PA に関しては、腎PA が 86 %、卵巣PA が 71 %、子宮PA が 70 %、肺PA が 39 % 阻害され、これらのPA は抗h-PA 抗体との cross-reactivity が認められた。

一方、先と同様にラット及びヒトUK 活性は抗h-PA 抗体によりほとんど影響を受けず、抗h-PA 抗体とは cross-reactivity は示さないことが明らかとなった。



Fig. 3-4. Zymography of rat plasminogen activators



Fig. 3-4. Zymography of rat plasminogen activators

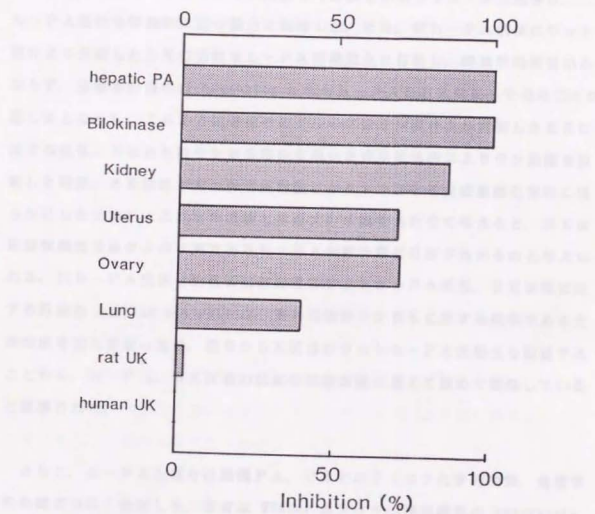


Fig. 3-5. Quenching of plasminogen activator activities in rat tissues by anti-h-PA antibody

【考察】

本章では初代培養肝細胞が産生するh-P Aに対する抗体を作製し、h-P Aと他の組織P A、B K、U Kとの免疫学的異同について検討した。

本研究で精製h-P Aを家兎に免疫して作製したポリクローナル抗体は、h-P A活性を特異的に且つ強力に阻害した。また、抗h-P A抗体はラット胆汁より分画したB Kの活性をh-P A同様完全に抑制し、酵素学的性質のみならず、生物学的活性の quenching からもh-P AとB Kは同一であることが明らかとなった。これまでに著者らのグループはウシ胆汁より精製したB Kに対する抗体、すなわち抗ウシB K抗体を用いた蛍光抗体法によりウシ組織を検索した結果、B K抗原が主に肝実質細胞に存在することを免疫組織化学的に明らかにした(25)。これらの成績と本論文の成績をあわせて考えると、B Kは肝実質細胞分泌タンパク質であるh-P Aが胆汁中に分泌されたものと考えられる。抗h-P A抗体と抗B K抗体両者のラットh-P A活性、B K活性に対する詳細な kinetic analysis は、B K抗体がウシB Kに対する抗体であるため検討を加えなかったが、抗ウシB K抗体がラットh-P A活性をも抑制することから、h-P A、B K両者の抗原性は動物種を越えて極めて類似していると推察された。

さらに、h-P Aと種々の組織P A、U Kとのタンパク化学的性質、免疫学的性質について検討した。著者は Wistar 系ラットの摘出臓器の homogenate よりロダナンモニウム (NH_4SCN) により組織P Aを抽出した。種々のラット組織P Aは zymogram 上でh-P AやB Kとほぼ同一の 60 k の位置に泳動され、比較的均一な分子種として観察されたが、ラット尿よりゲル濾過により精製したU K (38 k) とは明らかに異なった移動度を示した。また、各臓器中のP Aは子宮、肺、卵巣で高い活性を示し、これまでの報告とよく一致していた

(13, 14)。このうち心臓PAは透析により NH_4SCN を除去してしまうと、不溶性になってしまったことから、膜結合型の疎水性の高いPAであると考えられた。また、腎臓は尿中UKの主要な産生器官であることが知られており、腎培養細胞は尿中に見いだされるUKと同一のPAを産生することが報告されている(60)。しかしながら本研究においてラット腎臓より抽出されたPAはzymogram上で他の組織PAと同一の位置に泳動されるPAが主で、尿中UKと同様なPA分子は見いだされなかった。ヒト腎組織より NH_4SCN により抽出されるPAのほとんどが組織PAであり(48)、また、腎homogenateに精製UKを加えて同様に行った抽出操作によりUKはほぼ完全に回収されたことから(64)、腎臓におけるUKの貯蔵量が極めて少ないこと、UKは腎において不活性な前駆体として産生されること、抽出方法の問題等が考えられる。

これらの種々の組織PA、UKと抗h-PA抗体の反応性についてWestern blot analysisを検討したが、組織や尿に存在するPA量が少なく、blotは検出されなかった。そこで一定単位のPA活性に及ぼす抗h-PA抗体の影響、すなわちPA活性のクエンチングにより反応性を検討した。その結果、抗h-PA抗体は、腎臓、卵巣、子宮、肺のPA活性を86~39%阻害し、h-PAとこれらの臓器中のPAとが免疫学的相同性を示したが、ラットおよびヒトUK活性には何等影響を及ぼさず、h-PAとUKは免疫学的に異なるタンパク質であることが明らかとなった。

これまでにヒトをはじめとする哺乳類の組織PAやUKの免疫学的性質についてはいくつかの報告がある。

ヒト副腎PA(61)やヒト心臓PA(44)の活性は抗ヒトUK抗体により阻害されないこと、ブタ組織PAに対する抗体はヒト組織PA活性を阻害するがヒトUK活性は阻害しないことが既に明らかにされている(62)。また、これらの成績に反して、Bernik(63)らはヒト心臓PAはUKと同一の免疫学的性

質を示すと報告しているが、これはPAの抽出方法、作製した抗体の性質、抗原抗体反応の条件等の違いによるものと考えられる。

Rijken らはヒト子宮PAに対する抗体を作製し、ヒト子宮PAと甲状腺、腎臓、心臓、前立腺、唾液、涙PAは免疫学的相同性を示すが、UKとは異なる抗原性を有すること(64)、melanoma細胞が産生するPA(47)や血管壁が産生するPA(65)がヒト子宮PAと同一の抗原性を有することを報告した。組織PAに関して Christman (66) らは、全てのヒトPAは活性中心を含む同様な subunit を有するが、他の非触媒 subunit の構造が組織により異なり、PAの組織特異性が決まるという仮説を発表した。

以上のような報告と、著者の抗h-PA抗体を用いたh-PAと種々の組織PAとの免疫学的異同の結果からも、h-PAを含む組織PAはお互いに極めて類似した活性中心構造を有することが推察され、活性中心以外のシグナルペプチド等の構造が膜内在性等の組織特異性を支配している構造と考えられる。今後h-PAと組織PAの遺伝子レベルでの構造の比較検討が必要であると考えられる。

第4章 初代培養肝細胞における線溶活性化酵素 (h-PA)

産生調節機序

【緒言】

本章では肝臓におけるPA産生調節機序を検討する目的で、初代培養肝細胞系におけるh-PA産生調節機構について検討を行った。初代培養肝細胞は単離肝細胞や株化肝細胞とは異なり、ホルモン応答能をはじめとするほとんど全ての肝機能を *in vivo* の肝臓同様に有することが明らかにされている(37)。

そこで本章では初代培養肝細胞系を用いてh-PA産生測定系を確立するとともに、種々のホルモン、生理活性物質、薬剤がh-PA産生に及ぼす影響について検討を行い肝線溶活性調節機序の一端を明らかにしようと考えた(67)。

【方法】

① Fibrinogen 分解産物の調製

末梢における血栓形成がh-PA産生に及ぼす影響を検討する目的で、Fibrin 分解産物のh-PA産生に及ぼす影響について検討した。

本論文では fibrinogen の主要な plasmin 分解産物である fragment D, fragment E を fibrinogen の plasmin 分解物中より精製して用いた。

すなわち、plasminogen-rich fibrinogen (human grade L, Kabi) 1.3 g を borate buffer 50 ml に溶解し、streptokinase (バリダーゼ、日本レタリ-) 30,000 U と、防腐剤としてトルエン数滴を滴下し 37 °C で 18 hr incubate し fibrinogen degradation products (FgDP) を調製した。FgDP は超純水に対して 4 °C で 4 時間透析し、凍結乾燥後、0.03 M Tris-HCl, pH 8.0 に溶解し、同 buffer で平衡化した DEAE-Sephrose CL-6B column に apply

した。非吸着画分 (fragment D + E) を溶出後、0.8 M NaCl 含有同 buffer を用いた linear gradient 溶出を行い吸着画分 (fragment D) を溶出した。この非吸着画分は 0.05 M Acetate buffer, pH 5.0 で平衡化した CM-Sepharose CL-6B column に供し、同様に非吸着画分 (fragment D) を溶出後、fragment E を 0.5 M NaCl 含有同 buffer を用いた linear gradient 溶出法により溶出した。得られた fragment D, E は超純水に対して 4 °C、18 hr 透析後、凍結乾燥し、実験に用いた。これらの精製 fragments は SDS-PAGE 上で単一なバンドを示す標品として得られた。

② 初代培養肝細胞の単離及び培養

単離肝細胞は第 1 章で述べた collagenase 灌流法により単離し、collagen coated dish (25010 COL-1, CORNING) に 0.5×10^5 cells/cm² の割合で inoculate し、insulin (10^{-6} M, Sigma), glucagon (10^{-6} M, Sigma), EGF (1.6 nM, 東洋紡), 5 % fetal bovine serum (FBS, Tissue plus, 三菱化成) を添加した WILLIAM'S E (以後 WE と略称する) で培養した。培養液は培養開始 4 時間後に新鮮同培地に交換し、さらに 24 時間培養した。その後、これらの supplements を含まない WE でさらに 24 時間培養し実験に供した。すなわち、単離後 48 時間初代培養後の肝細胞 (以後この細胞を zero time cell と呼称する) を用い、これらの初代培養肝細胞に insulin, glucagon, EGF, epinephrine (Sigma), dexamethasone (Sigma) 等のホルモンや、forskolin, 3-isobutyl-1-methyl xanthine (IBMX, Sigma), actinomycin D (Sigma), cycloheximide (ナカライテスク), H-8 (生化学工業) 等の薬剤を含む WE を作用させ、24 時間培養後培養液を回収し h-P A 活性等の測定を行った。

培養液中の h-P A 活性は既述の standard fibrin plate 法 (第 1 章 方法 ③) もしくは ¹²⁵I-fibrin plate 法 (第 3 章 方法 ⑥) により測定した。測定方法の基本的原理、また、得られる結果については両測定法とも差異はないが、

後者は多検体を短時間で測定するのに有利である。本章では fibrin 分解産物の h-P A 産生に及ぼす影響についての実験の結果 (Fig. 4-9, Fig. 4-10, Fig. 4-11) は 125 I-fibrin plate 法により得た。

③ 肝細胞内 cAMP 濃度の測定

Zero time cell に種々のホルモンをはじめとする試料を作用させ、一定時間 incubation 後、培養液を除去し、沸騰浴中で加温した 0.2 M 3-isobutyl-1-methyl xanthine (IBMX) 含有 PBS を加え (1ml/60 mm dish)、反応を停止させた。細胞はラバーポリスマンで培養面から剥離し回収し、さらに同 buffer 1 ml を加えて計 2 ml の buffer で細胞懸濁液として回収した。細胞は超音波破砕器で破砕後、遠心分離 (3,000 rpm, 10 min) し、上清を採取した。上清は沸騰浴中 3 min 加熱処理し、同様に遠心分離し除タンパクを行った。

この上清中のタンパク量は Bio Rad protein assay kit (Bio Rad) により、cAMP 量はサイクリックAMP測定キット (ヤマサ醤油) により測定した。

④ 初代培養肝細胞培養液中の線溶活性阻害物質の検索

初代培養肝細胞培養液中に産生された plasminogen activator inhibitor (PAI) をはじめとする線溶活性阻害物質の検索は、酵素として精製 h-P A、および UK を用いて行った。

Dexamethasone (10^{-6} M) 添加培養液で zero time cell を 24 時間培養後、回収した培養液 50 μ l と、h-P A (0.4 U/ml) または UK (0.4 U/ml) 50 μ l とを混合し、4 $^{\circ}$ C, 12 hr 反応させた後、残存活性を fibrin plate 法により測定して control の培養液のそれと比較した。

【結果】

① 培養液中の h-P A 活性に及ぼす種々ホルモンの影響

培養液中の h-P A 活性に及ぼすホルモン類の影響を検討した。

Fig. 4-1 に示す control はホルモン類無添加の WE 培養液による h-P A 産生量を示す。ここに得られた活性から、初代培養肝細胞は WE で 24 hr 培養すると、UK 換算で $5 \sim 10$ U の P A を培養液中に産生することがわかった。

Insulin や EGF は培養液中の h-P A 産生にほとんど影響を及ぼさなかったが、glucagon (10^{-7} M) や epinephrine (10^{-6} M) は h-P A 産生を control の 1.5 ~ 2.5 倍増大させた。一方、dexamethasone は h-P A 産生を強力に抑制した。

Epinephrine と glucagon のホルモン作用の少なくとも一部は cAMP を second messenger として発現していることは既に広く知られている。そこで、これらのホルモンの h-P A 産生調節機序を明らかにするために glucagon (10^{-6} M)、epinephrine (10^{-6} M)、insulin (10^{-6} M)、EGF (10^{-8} M) の肝細胞内 cAMP 濃度に及ぼす影響を検討した (Fig. 4-2)。ここにはホルモン類処理を 5 分間行った後の細胞内 cAMP 濃度を示した。Glucagon, epinephrine は細胞内 cAMP 濃度を顕著に増大させたが、insulin, EGF は細胞内 cAMP 濃度にほとんど変化を与えず、h-P A 産生増大機構への cAMP の関与が示唆された。

また、h-P A 産生は 3-isobutyl-1-methyl xanthine (IBMX) や forskolin により細胞内 cAMP 濃度を上昇させることにより増大した (Fig. 4-3)。IBMX (1mM) および forskolin (20μ M) の両者ともに h-P A 産生を control の約 3 倍増大させた。この結果は、それぞれ cAMP phosphodiesterase inhibitor や adenylatecyclase activator に共通の作用である細胞内 cAMP 濃度の上昇作用によって h-P A 産生を増大させることが示唆された。

そこで、cAMP の誘導体である dibutyryl cAMP (以下 dbcAMP と略称する)

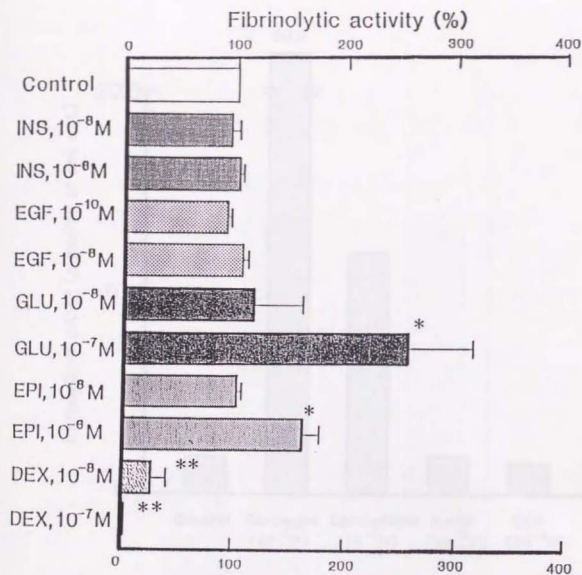


Fig. 4-1. Effects of several hormones on h-PA production of rat hepatocytes in primary culture. The activity of the control was taken 100 %. INS, insulin; EGF, epidermal growth factor; GLU, glucagon; EPI, epinephrine; DEX, dexamethasone. Each bar shows mean \pm S.D. obtained from 5 cultures. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

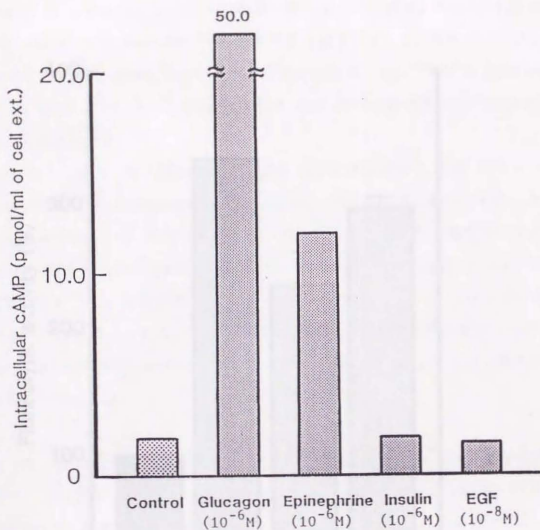


Fig. 4-2. Intracellular cAMP level of hepatocytes cultured in the media containing several hormones. The hormones were challenged to hepatocytes and incubated for 5 min. Then the hepatocytes were treated with boiled PBS containing IMX to extract intracellular cAMP followed by measuring cAMP concentration by using commercial RIA kit. Each bar is an average of 3 cultures.

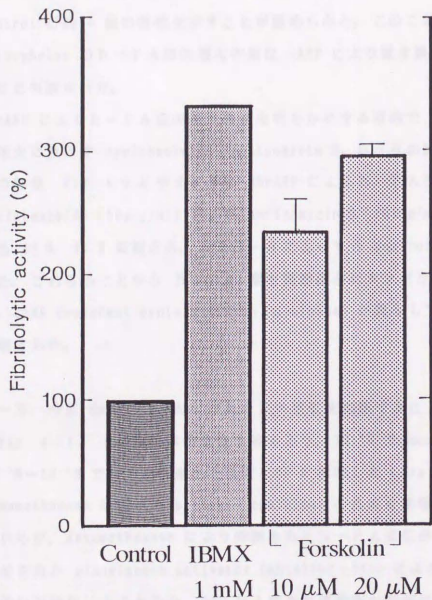


Fig. 4-3. Effect of IBMX and forskolin on the h-PA production.

Suppression of cAMP degradation by IBMX, as well as augmentation of cAMP production by forskolin, resulted in a significant elevation of the production. Each bar represents mean \pm S.D. of 5 cultures.

を用い、h-P A 産生に及ぼす影響を検討した。その結果、Fig. 4-4 に示すように dbcAMP は濃度依存的に h-P A 産生を増大させ、 $10^{-7}M \sim 10^{-8}M$ では control の約 4 倍の活性を示すことが認められた。このことから glucagon, epinephrine の h-P A 産生増大作用は cAMP により置き換えることが可能であると判断された。

cAMP による h-P A 産生増大機構を明らかにする目的で cAMP の h-P A 産生増大に及ぼす cycloheximide, actinomycin D, H-8 の影響を検討した。その結果 Fig. 4-5 に示すように dbcAMP による h-P A 産生増大作用は cycloheximide ($50 \mu g/ml$) および actinomycin D ($10 \mu g/ml$) のいずれによっても 88%, 93% 抑制され、また H-8 によっても control レベルまで抑制された。これらのことから h-P A 産生調節機序にタンパク合成系、mRNA 合成系、cAMP dependent protein kinase (A-kinase) が関与している可能性が強く示唆された。

一方、今回 dexamethasone が h-P A 産生を抑制することを発見したが (Fig. 4-1)、その作用は濃度依存的であり、 $10^{-8}M$ で control の 75%, $10^{-7}M \sim 10^{-6}M$ で h-P A 産生をほぼ 100% 抑制した (Fig. 4-6)。Dexamethasone は種々の protease inhibitor の合成を誘導することが知られているが、dexamethasone により抑制された h-P A 産生が培養液中に同時に産生された plasminogen activator inhibitor (PAI) による培養液中での不可逆的な不活化によるものか、h-P A 産生の直接的な抑制によるものかを検討する目的で、dexamethasone 添加培養液について zymography を行うとともに、fibrinolytic inhibitory activity の測定を行った。

Dexamethasone 添加培養液について行った zymography の結果、Fig. 4-7 に示すように各々の濃度の培養液中の h-P A 活性に基づく lysis area は、分子量 60 k に相当する位置に現れ、その濃度は $10^{-8}M$ 以上では明らかに小さく

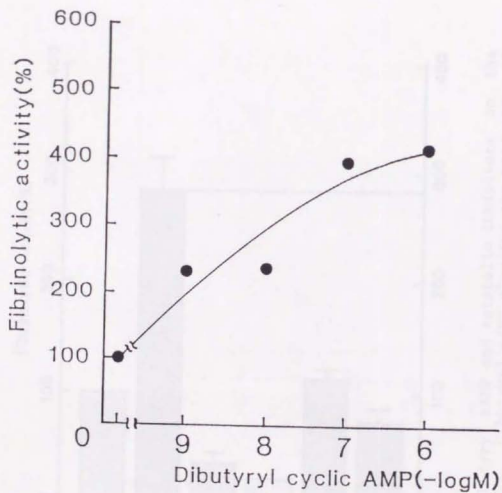


Fig. 4-4. Dose-response curve of dibutyryl cAMP effect on h-PA production.
Each point is an average of 3 cultures.

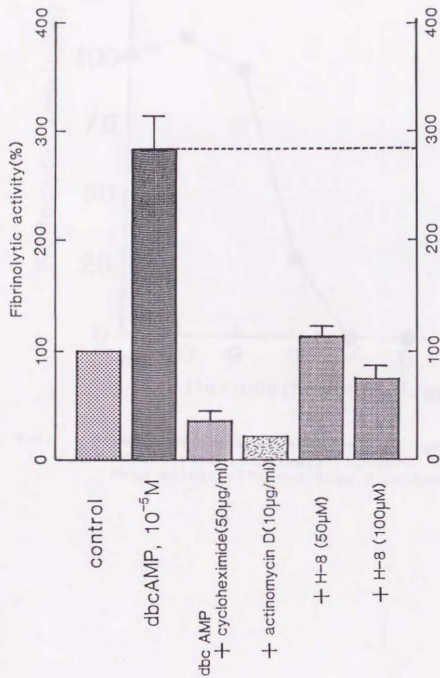


Fig. 4-5. Effect of dibutyl cAMP and metabolic inhibitors on the production of h-PA. Dibutyl cAMP elevated the production of h-PA 3 times higher than the control, whereas further addition of the metabolic inhibitors to the medium containing dibutyl cAMP caused significant suppression of h-PA production. Each bar represents mean \pm S.D. of 5 cultures.

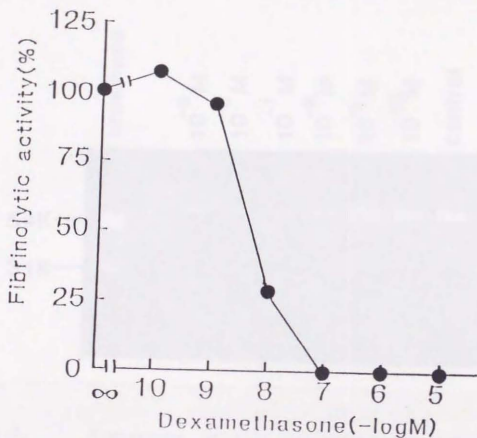


Fig. 4-6. Effect of dexamethasone on h-PA production of rat hepatocytes in primary culture.
Mean values obtained from 3 cultures are plotted.

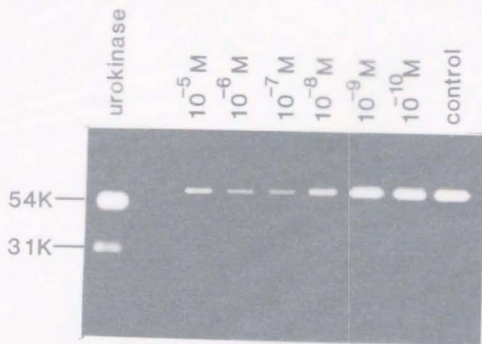


Fig. 4-7. Zymography of h-PA in conditioned medium containing various concentration of dexamethasone. Human urokinase (UK) was also subjected to the gel electrophoresis, and the upper lysis area was due to the high molecular weight type UK (54 kD) and the lower one, to the low molecular weight form (31 kD). Primary culture of rat hepatocytes produced a PA of 60 kD. The lysis area was dose-dependently diminished by the addition of dexamethasone.



Fig. 4-7. Zymography of h-PA in conditioned medium containing various concentration of dexamethasone. Human urokinase (UK) was also subjected to the gel electrophoresis, and the upper lysis area was due to the high molecular weight type UK (54 kD) and the lower one, to the low molecular weight form (31 kD). Primary culture of rat hepatocytes produced a PA of 60 kD. The lysis area was dose-dependently diminished by the addition of dexamethasone.

Fig. 4-6 に示した h-PA 産生量によく相関していた。また、60 k の h-PA の lysis area 以外に PAI-1・h-PA 複合体に相当する lysis area は観察されなかった。このことは dexamethasone による h-PA 産生抑制は、dexamethasone により誘導が予想される PAI-1 等による 2 次的な h-PA の不活化によるものではなく、h-PA 自体の産生量の減少による可能性を示唆している。

さらに、dexamethasone 添加培養液中について plasminogen activator inhibitory activity の有無を検討した結果を Fig. 4-8 に示す。初代培養肝細胞培養液より精製して得た h-PA と、ラット尿中より得た UK を用い、これらの活性に対する阻害効果をみた。縦軸は残存活性を、横軸は dexamethasone 添加培養液の希釈率を示す。ここには h-PA 産生を完全に抑制した 10^{-6} M dexamethasone 添加培養液について測定した inhibitory activity を示したが、これらの培養液は h-PA 活性、UK 活性には何等影響を及ぼさなかった。このことから初代培養肝細胞系において dexamethasone は PAI-1 等の fibrinolytic inhibitor を誘導しないことが明らかとなった。

② h-PA 産生に及ぼす血液凝固・線溶系関連物質の影響

Thromboxane A_2 (TXA_2) 様活性作用を有する prostaglandin endoperoxide の安定合成アナログ U-46619 と prostaglandin I_2 (PGI_2) が h-PA 産生に及ぼす影響について検討した結果を Fig. 4-9 に示した。 10^{-6} M, 10^{-7} M の U-46619 は h-PA 産生を 1.5~2.0 倍増大させたが、高濃度 (10^{-5} M) の U-46619 は h-PA 産生を約 50 % 抑制した。これに対して PGI_2 は h-PA 産生にほとんど影響を及ぼさなかった。

また、fibrin の主要な plasmin 分解 fragment である fragment D, E の影響を Fig. 4-10 に示した。Fragment E は h-PA 産生にほとんど影響を示さなかったが、fragment D は濃度依存的に h-PA 産生を増大させ $100 \mu\text{g/ml}$

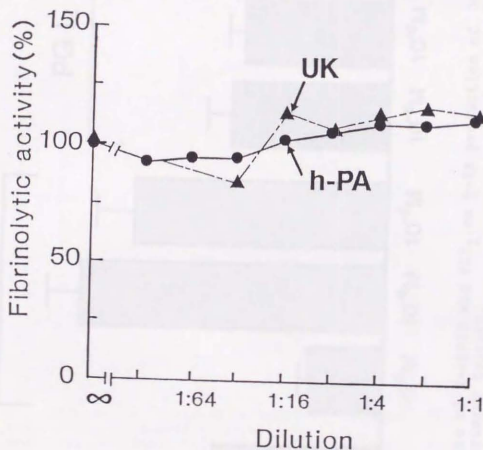


Fig. 4-8. Absence of h-PA inhibitors or UK inhibitors in the medium in which hepatocytes were cultured in the presence of 10^{-8} M dexamethasone. Purified h-PA (●) or UK (▲) was added to the conditioned medium of hepatocytes treated with dexamethasone, and incubated for 24 hr at 4°C . The residual activity was measured by the fibrin plate assay. Average % of triplicated experiments is plotted.

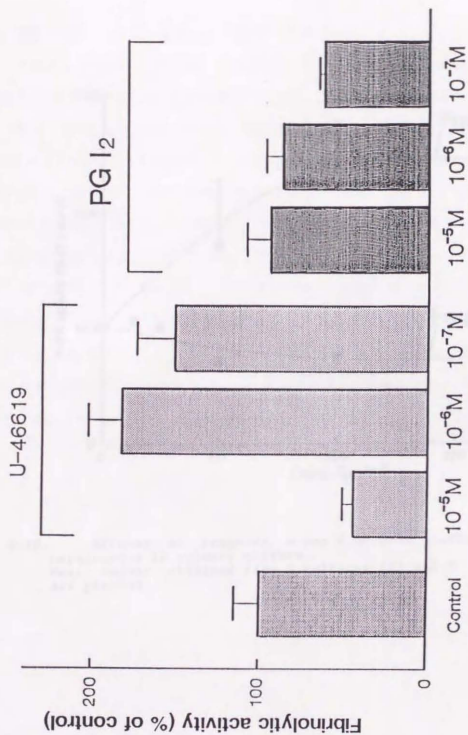


Fig. 4-9. Effects of U-46619 and PGI₂ on h-PA production of hepatocytes in primary culture.
Each bar shows mean \pm S.D. obtained from 5 cultures.

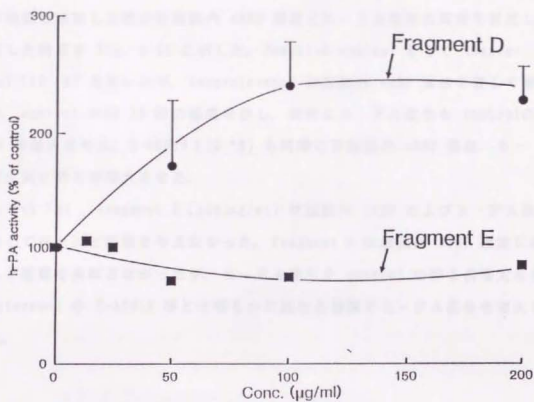


Fig. 4-10. Effects of fragment D and E on h-PA production of rat hepatocytes in primary culture. Mean values obtained from 3 cultures (E) and 5 cultures (D) are plotted.

の濃度では control の約 2.5 倍増大させた。

さらに、U-46619, fragment D の h-P A 産生増大機構を検討する目的でこれらの物質を添加した際の肝細胞内 cAMP 濃度と h-P A 産生の両者を対比して検討した結果を Fig. 4-11 に示した。Positive control として isoproterenol (10^{-6} M) を用いたが、isoproterenol は細胞内 cAMP 濃度を著しく増大させ、control の約 19 倍の濃度を示し、同時に h-P A 産生も control の約 2.5 倍増大させた。U-46619 (10^{-6} M) も同様に肝細胞内 cAMP 濃度、h-P A 産生共に約 2 倍増大させた。

PGI_2 (10^{-6} M), fragment E ($300\mu\text{g/ml}$) は細胞内 cAMP および h-P A 産生に対してほとんど影響を与えなかった。Fragment D は細胞内 cAMP 濃度にはほとんど影響を及ぼさなかったが、h-P A 産生を control の約 3 倍増大させ isoproterenol や U-46619 等とは明らかに異なる機構で h-P A 産生を増大していた。

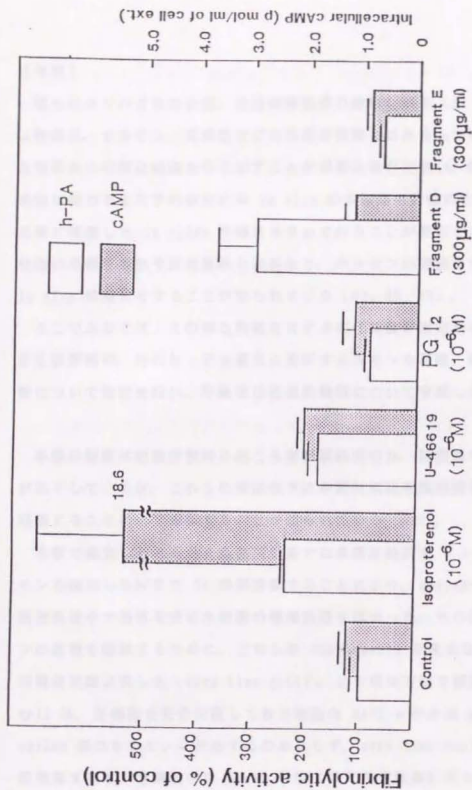


Fig. 4-11. The effect of several substances on the h-PA production and intracellular cAMP level in rat hepatocytes in primary culture. Each bar shows mean \pm S.D. obtained from 5 cultures.

【考察】

種々のタンパク質の合成、分泌制御機構の動物レベル (*in vivo*) での研究では神経系、ホルモン、栄養素などの要素が複雑に絡み合っているため、得られた結果から明確な結論を引き出すことが困難な場合が多い。従って、肝臓や肝機能に関わる生化学的研究には *in vivo* の多種類の肝機能とホルモン応答能を正確に模倣した *in vitro* 実験系を用いて行うことが要求される。初代培養肝細胞は単離肝細胞や肝細胞株とは異なり、ホルモン応答能や代謝調節機能を *in vivo* 同様に有することが知られている (37, 68, 69)。

そこで本章では、このような特徴を有する初代培養肝細胞系を用いて h-P A 産生調節機構、特に h-P A 産生に及ぼすホルモンや凝固・溶液関連物質の影響について検討を行い、肝線溶活性調節機構について考察した。

単離肝細胞は細胞分散時に起こる細胞膜損傷の為、肝機能やホルモン応答能が低下しているが、これらの機能低下は単離肝細胞を数時間から 24 時間初代培養することにより回復することが知られている (69)。

本章で確立した h-P A 産生測定系では単離肝細胞を 5 % 血清及び諸種ホルモンを添加した WE で 24 時間培養することにより、collagenase 消化や肝細胞精製途中で損傷を受けた細胞の機能回復をはかった。その後、血清やホルモンの影響を排除するために、これらの supplements を含まない WE で 24 時間培養後実験に供した (zero time cell)。このような方法で調製した zero time cell は、肝機能を充分回復しており細胞内 cAMP レベルは glucagon, epinephrine 等のホルモンに反応するのみならず、zero time cell を WE で 24 時間培養すると、培養液中に 5~10 単位 (U K 単位換算) の h-P A を産生した。

培養液中の h-P A 産生は insulin, EGF により影響を受けなかった。Insulin は肝細胞の初代培養を行う場合細胞成長因子として必須であり、高濃

度 (10^{-8} M) の insulin は細胞増殖を promote する (70)。EGF は mouse 顎下腺より単離された最初の増殖因子であり、上皮細胞のみならず非上皮系を含め多くの細胞に作用し、細胞増殖に加えホルモンの合成・分泌等の分化した細胞の機能をも促進する (71)。EGF は zero time cell を用いた 24 時間の培養系では h-P A 産生にほとんど影響を与えなかったが長期間の培養では h-P A 産生を強く亢進させるという結果が得られているので (36)、何等かの機構で肝細胞の P A 産生機能維持に働くことが推察された。

Epinephrine (10^{-6} M)、glucagon (10^{-7} M)、isoproterenol (10^{-6} M) は h-P A 産生を増大させた。肝臓におけるタンパク質代謝をはじめ、脂質、糖代謝、尿素合成に対し insulin と glucagon は reciprocal に働くことが知られている。培養液中の h-P A 産生に関しては、glucagon で増大したが、insulin では変化がなく、また、抑制されるようなことはなかった。 β -adrenergic agonist の 1 つである epinephrine は β -receptor に作用し、細胞内 cAMP を second messenger としてホルモン作用を発現すると考えられている。また、一般に glucagon の肝臓におけるホルモン作用も glucagon 処理した細胞の cAMP 濃度が著増する上、dibutyryl cAMP でその生理作用が置き換えることが可能であることから、ホルモン作用発現の少なくとも一部分に cAMP 情報伝達系が関与していると考えられる (69)。これらのホルモンによる h-P A 産生の増大と細胞内 cAMP 濃度には相関関係が認められ、また、cAMP phosphodiesterase の阻害剤である IBMX や adenylatecyclase の賦活剤により細胞内 cAMP 濃度を増大させることによっても h-P A 産生は増大した。さらに、これらのホルモンや薬剤の作用は dibutyryl cAMP により置き換えることが可能であった。

一方、cAMP による h-P A 産生増大は cycloheximide, actinomycin D や cAMP dependent protein kinase (A-kinase) の阻害剤、H-8 により抑制され

た。このことは cAMP による h-P A 産生増大機構に何等かの形で cAMP dependent protein kinase やタンパク合成系、mRNA 合成系などが関与していることを示している。

cAMP は高等動物の遺伝子発現に重要な役割を果たしている。肝臓においては tyrosine aminotransferase (72), ornithine decarboxylase (73), phosphoenolpyruvate carboxy kinase (74) や fibronectine (75) の mRNA は cAMP により増大し、これらの酵素やタンパクをコードしている遺伝子の 5'-flanking region には cAMP responsive element (CRE) の存在が示唆されている (76)。

合成グルコルチコイドである dexamethasone は h-P A 産生を強力に抑制した。Dexamethasone は一般的に遺伝子発現に促進的に働くことが知られていた。しかし、最近 dexamethasone が β -globin (77), α -fetoprotein (78), proopiomelanocortin (79) の遺伝子発現に対して抑制的に働くことが明らかにされた。

また、線溶系に関して dexamethasone はヒト初代培養肝細胞 (80)、ラット hepatoma 細胞 (81) で P A I や fibrinolytic inhibitor を誘導するとする報告がある。しかしながら、著者の行ったラット初代培養肝細胞系においては、P A I や fibrinolytic inhibitor の誘導は認められず、h-P A 産生のみを抑制することが明らかとなった。現在は著者の研究グループが h-P A の遺伝子発現が dexamethasone により抑制されるという実験的結果を得てきている。

Fibrin の plasmin 分解物である fragment D やある種の prostaglandin も h-P A 産生を増大させた。

Fragment D, E は fibrin の安定な可溶性分解産物であり、これらの血中量の測定は生体内での血栓形成の有無や血栓症の診断に有効であることが示され

ている (82, 83)。さらに、これらの分解産物は免疫抑制作用 (84)、macrophage の HSF (hepatocyte stimulating factor) 産生刺激作用 (85)、fibrinogen 合成促進 (86, 87, 88)、造血細胞の増殖促進 (89) 等の生理活性を有することが明らかにされ注目されている。Fragment E は h-P A 産生にほとんど影響を及ぼさなかったが、fragment D は h-P A 産生を増大させた。Fragment D による h-P A 産生増大には細胞内 cAMP 濃度の増大は伴わなかった。また、データは示さなかったが、これらの h-P A 産生増大に C-kinase の阻害剤である H-7 は影響を及ぼさなかったことから、この産生増大に A-kinase, C-kinase 以外の系の関与が考えられる。

アラキドン酸の代謝産物である thromboxane A_2 (TXA_2) や prostaglandin I_2 (PGI_2) は血栓形成の調節に重要な役割を果たしている。 TXA_2 は強い血小板凝集惹起作用を有し、白色血栓 (血小板血栓) 形成に中心的役割を果たしている (90)。 TXA_2 は collagen, ADP 等の血小板凝集惹起物質により血小板内で速やかに産生・放出され、さらに周囲の血小板を活性化することにより血栓形成を促す。一方、 PGI_2 は血管内皮細胞で合成され、局所的に血栓の過剰形成を防止している。 PGI_2 は血小板の adenylate cyclase を活性化し細胞内の cAMP 濃度を増大させることにより血小板凝集を抑制し、 TXA_2 による過剰な血小板の活性化を防止している。

TXA_2 の生体内での半減期は 40 秒前後であることから、本研究においては TXA_2 と同様の作用を有する TXA_2 の合成アナログ、U-46619 を用いた。生理的濃度 ($10^{-7} \sim 10^{-6} M$) の U-46619 は h-P A 産生を増大させたが、高濃度 ($10^{-5} M$) の U-46619 は逆に h-P A 産生を抑制した。また、 $10^{-6} M$ における h-P A 産生増大は細胞内 cAMP 濃度の増大も伴っていた。 PGI_2 は h-P A 産生に影響を及ぼさず、肝細胞においては細胞内の cAMP 濃度にも変化を与えなかった。

以上の結果から初代培養肝細胞におけるh-PA産生がある種のホルモンや血液凝固・線溶系関連物質により増減することが明らかとなった。PAの産生調節機序について種々の培養細胞を用いた実験系での報告があるが、これらは癌化細胞や株化細胞を用いたものがほとんどで、*in vivo*におけるPAの産生調節機序の理解に直接結び付くものは少ない。本研究では初代培養肝細胞系を用い肝線溶活性調節機序の一端を初めて明らかにしたという点で意義深いものと考えられる。

第5章 肝線溶活性化酵素の生理的・病態生理的作用の検討

— 実験的肝障害ラットにおける h-P A 産生の変動

【緒言】

これまで、肝臓及び肝実質細胞に線溶活性化酵素 (h-P A) が存在すること、h-P A の免疫学的、酵素学的性質に加え肝細胞における h-P A の産生調節機序について述べてきた。現在までに P A は、生体内で plasminogen の activation による血栓除去のみならず、様々な生理的・病態生理的現象との関連が明らかにされている。

古くから肝疾患と血中線溶活性/P A 活性との関連性についての報告があるが、肝臓の線溶活性と血中線溶活性、肝の生理・病態と線溶活性に関する研究はほとんどない現状である。

そこで本章では h-P A の肝臓での生理的・病態生理的作用を検討する目的で、実験的肝障害ラット、特に肝硬変における P A 活性についてその病態と肝 P A の関連について様々な角度から検討を行い、in vivo における h-P A の挙動並びにその作用の考察を試みる。

【方法】

① 肝硬変ラットの作製

肝硬変ラットの作製は McLean ら (91) の方法を改良した方法により行った。120g~130g の Wistar 系雄ラット (日本生物材料センター) を固形飼料 (CE-2、日本クレア) および蒸留水を自由に摂取させて1週間予備飼育した後実験に供した。予備飼育後、ラットは固形飼料及び 0.5 g/l phenobarbitone 水を自由に摂取させ、phenobarbitone 投与 1 週間後より週 1 回の割合

で四塩化炭素蒸気の吸入を 11 週にわたり行った。

四塩化炭素蒸気の吸入は Fig. 5-1 の様な装置を作製し、図中のダンボール製の箱の中にラットを入れ、四塩化炭素を満たして連結した 2 本の洗浄瓶に 1 l/min の割合で 95 % O_2 / 5 % CO_2 ガスを 2 分間送り、その後 2 分間放置して計 4 分間吸入させた (第 1 週～第 8 週)。第 9 週～第 11 週目では四塩化炭素蒸気を 3 分間送り、3 分間放置し計 6 分間の吸入を行った。

第 11 回目の吸入終了 3 日後にラットはネンブタール麻酔下でサンプルを採取した。すなわち、血漿は抗凝固剤として 3.8 % クエン酸 3 ナトリウム溶液 0.5 ml を含む注射筒に頸静脈より 5 ml 採血し、得られた血液は直ちに 3,000 rpm, 20 min 遠心分離して調製した。血清は血漿調製用の血液の採血終了後の頸静脈より放血液をガラス製の試験管に採取し、4 °C 一夜放置後 2,500 rpm, 20 min 遠心分離し血清を調製した。

肝臓は第 3 葉と第 5 葉の特定の部位より、凍結切片作製用、パラフィン包埋検体作製用として採取し、凍結切片作製用検体はアセトンドライアイス中 (-50 °C) で急速凍結させ、パラフィン包埋用検体は直ちに固定を行った。

DNA 量測定用検体、proline, hydroxyproline 測定用検体についても第 3 葉の特定の部位より検体を調製した。

② 硬変群及びコントロール群ラットの肝臓並びに血液の生化学的検討

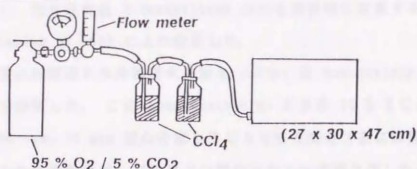
1) 肝臓 Proline, Hydroxyproline 量の測定

一定量の肝臓を精秤し飽和ピクリン酸とともに homogenize し、遠心分離 (3,500 rpm, 20 min) 後、上清を 0.02 N HCl で平衡化した MCI ゲル (2 ml, 三菱化成) カラムに apply し、3 ml の 0.02 N HCl で溶出した。

溶出画分は evaporate 後、Pico-Tag column (Waters) を用いた HPLC (Hitachi, 655A-11) で proline, hydroxyproline 量を測定した。

Animal : male Wistar strain, 120-130 g
(normal pellet diet, 0.5 g/l phenobarbitone)

CCl₄ inhalation : once a week



1 st - 8 th week : Gassing 2 min.

9 th - 11 th week : 3 min.

Examination of Haemostatic and inflammatory parameters.

Plasma fibrinogen	—————	Tyrosine method
Plasma total protein	—————	Bradford's method
GOT	—————	Karman's method
GPT	—————	Wroblewsk's method
Plasma plasminogen activator	—————	zymography

Histological and Chemical Analyses of Liver Tissue.

Histological observation	—————	Mallory-Azan staining
Tissue localization of h-PA	—————	Fibrinolysis autography
Proline and hydroxyproline contents	—————	amino acid analysis

Fig. 5-1. Production of rats with liver cirrhosis and measurement of haemostatic parameters.

2) 肝DNA量の測定

肝組織DNA含量は肝組織のホモジネートより Schneiderら (92) の方法により全核酸を抽出し、加水分解後 2-deoxyribose のみを選択的に定量することができる diphenylamine 法 (93) により定量した。

すなわち、一定量の肝組織に氷冷蒸留水を加え Potter 型 homogenizer で 20 % homogenate を調製した。この homogenate 1 ml に氷冷 10 % TCA 2.5 mlを加え 3,000 rpm, 10 min 遠心分離しTCA可溶性画分(主に燐酸化化合物)を除去し、得られた沈澱に対し同様にこの操作をもう一度繰り返した。

得られた沈澱に蒸留水 1ml を添加懸濁後 4 ml の 95 % エタノールを加え十分湿和後同条件で遠心分離した。さらに 95 % エタノール 5 ml で沈澱を抽出洗浄後、エタノール・エーテル (3 : 1) 混液 5 ml を添加懸濁し、3 分間煮沸して脱脂した。同様に 3 回エタノール・エーテル抽出を行い燐脂質の除去を行った。

脱脂後の肝組織は 1.3 ml の蒸留水に懸濁し、さらに同量の 10 % TCA 溶液を加え 90 °C, 15 min 加水分解した。分解後遠心分離し、沈澱をさらに 5 % TCA で抽出し、両者の上清を合わせてDNA定量用検体とした。

この検体溶液 1 ml に 2 ml の diphenylamine 溶液 (1g の diphenylamine を酢酸 100 ml, 濃硫酸 2.75 ml の混液に溶解させたもの)を加え沸騰浴中で 15 min 加熱し 660 nm の吸光度を測定し、同様に calf thymus DNA (Type I, Sigma) を用いて作成した検量線から肝DNA含量を算出した。

3) 血漿 total protein, fibrinogen, 血清 G O T, G P T の測定

Total protein は Bio Rad protein assay kit (Bio Rad) によりウシ血清アルブミンを standard として測定した。

血漿 fibrinogen 量は tyrosine 法 (94) により測定した。この方法は fibrin の tyrosine 残基のしめる割合が 9.3 % であることを利用し、精製し

た fibrin clot 中の tyrosine 量から fibrinogen 量を算定する方法である。

すなわち血漿 0.2 ml に 0.4 g/dl $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 ml, 20 U/ml thrombin 0.2 ml を加え 37 °C 1 時間 incubate し、fibrin 塊を形成した。

Fibrin 塊 (fibrin clot) はガラス棒で圧縮しながら全量まきとり、蒸留水中で non-clottable protein を洗浄除去した。Clot は濾紙上で十分水分を除去した後、10 g/dl NaOH を加え、沸騰浴中で fibrin clot が完全に溶解するまで加熱した。アルカリ分解後蒸留水 5 ml を加えて希釈し、フェノール試薬 1 ml を加えてよく攪拌し、さらに蒸留水 3.8 ml を追加混和後、20 g/dl Na_2CO_3 3 ml を加えてよく混和し、室温 30 分以上放置したのち 660 nm の吸光度を測定し、得られた tyrosine 量から fibrinogen 量を算出した。

血清 GOT、GPT 活性は市販のキット (UV テストワコー、和光純薬) により測定した。

4) 血清アミノ酸組成の定量

血清アミノ酸組成は血清をピクリン酸で除タンパク後、日立アミノ酸自動分析装置 (#835) により測定した。すなわち、血清 100 μl に飽和ピクリン酸 200 μl を加え 10,000 rpm, 20 min 遠心分離して除蛋白した。得られた上清は 0.02 N HCl で平衡化した MC I ゲルカラム (2 ml) に供し、脱ピクリン酸した。0.02 N HCl 3 ml 溶出したサンプルはロータリーエバポレーターで乾固させた後、アミノ酸分析を行った。

5) Zymography による血漿線溶活性の測定

血漿中の線溶活性は第 1 章 (方法 ⑤) で詳述した zymography により解析した。

コントロールラットおよび硬変群ラット血漿より euglobulin 分画を調製した。血漿 50 μl に 450 μl の 0.5 M acetate buffer, pH 4.0 を加え 30 分間

氷水中に放置した。遠心分離 (12,000 rpm, 20 min) により euglobulin 分画を沈澱させた後、上清を除去した。沈澱は 0.15 M NaCl 含有 0.05 M Tris - HCl, pH 8.0, 50 μ l に溶解させた。これに等量の sample buffer を添加し SDS-PAGE に供した。

② 硬変群及びコントロール群ラット肝臓の組織学的検討

1) 肝組織の固定およびパラフィンブロックの作製

5 × 5 × 5 mm 前後に切り出した肝組織を 50 °C に保温した中性等張ホルマリン溶液 (0.85 % NaCl, 3.5 % ホルマリン*) 中で 1 時間固定した。固定した肝組織は合成樹脂製のネットに入れネットごと蒸留水中で水洗した。水洗後アルコール系列 (8 段階、すなわち 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % 溶液で各々 1.5 時間浸潤後、100 % 溶液で 1.5 時間 2 回浸潤、さらに 100 % で 12 時間以上浸潤) で脱水した。脱水後濾紙でアルコールを吸い取り安息香酸メチル処理 (3 段階、1.5 時間浸潤後、0.5 時間 2 回浸潤) し、同様に濾紙で安息香酸メチルを除去した後ベンゼン処理 (3 段階、15 分 3 回浸潤) を行った。さらにベンゼン/軟パラフィン溶液 (35~40 °C に保温したベンゼンに軟パラフィン <44~46°C、関東化学) を飽和させたもの) 中に 1.5 時間放置した。続いて軟パラフィン溶液 (軟パラフィンを加温溶解させた溶液に 1.5 時間以上 2 回浸潤)、硬パラフィン溶液 (硬パラフィン <58~60 °C、関東化学) を加温溶解させた溶液に 1.5 時間以上 2 回、3 時間以上 1 回浸潤) 処理した。硬パラフィン溶液処理後肝組織はネットから出し、硬パラフィン溶液中で冷却してパラフィン中に包埋し、パラフィンブロックとした。

2) 肝組織のアザン・マロリー染色 (95)

パラフィン包埋肝組織をマイクロームで厚さ約 3 μ の薄片にスライスした。この切片を卵白アルブミン (卵白とグリセリンを 1:1 で混合したもの) をコ

ートしたスライドガラスに貼付し、60℃の湯浴中で切片のしわを伸ばした後80℃のホットプレート上で乾燥・固定した。

固定後キシロール系列（キシロール 3 分間 2 回浸潤、フェノール/キシロール(1:1)、5 分間浸潤）で脱パラフィンを行い、さらに蒸留水で切片を洗浄後 アゾカルミン G 浮遊液（56～60℃）で 60 分間処理し、室温まで冷却した後蒸留水で過剰に付着した色素を除去した。

さらにアニリン・アルコール（90% エタノール 100 ml に 100 μ l のアニリンを加えたもの）で核が赤色に染色され、且つ他の組織が十分退色するまで分別した。分別はスライドガラスを酢酸アルコール（90% エタノール 100 ml に 1 ml の水酢酸を加えたもの）で軽く洗い流すことにより停止させた。

停止後 5% 燐タングステン酸水溶液で 1～3 時間結合組織を媒染し、水洗後アニリン青・オレンジ G 混合液（アニリン青 0.5 g、オレンジ G 2 g を蒸留水 100 ml に溶解し、水酢酸 8 ml を添加し煮沸した後、冷却濾過して使用）で 1～3 時間染色した。水洗後 96% エタノールでさらに分別を行いキシロール系列（フェノール/キシロール(1:1)に 5 分間、キシロールに 3 分間 2 回浸潤）で透徹後、封入剤（Entellan neu, MERCK）で封入し、プレパラートを作製し、検鏡した。

3) Todd 法による肝線溶活性の検討

- 50℃ アセトン中で凍結させた肝組織はクリオスタットを用いて 6 μ の連続切片を作製した。得られた切片は中央に線を引いたスライドガラスの右半分

に 3 枚並べ、ドライヤー（冷風）を用いて乾燥・固定した。

切片を固定したスライドガラスは水冷したステンレス板上で冷却し、スライドガラスの左半分に 0.6% fibrinogen 溶液（plasminogen-rich または-free fibrinogen in borate buffer）0.12 ml, 20 U/ml thrombin 0.02 ml を乗せガラス棒で 2 液をすばやく混和させ切片上に fibrin film を作製した。

スライドガラスは fibrin 膜が乾燥しないように保湿容器に水平に入れて密

閉し、37℃恒温槽中で48~120時間 incubate した。Incubation 後ホルマリ
ンで1時間以上蒸気固定し、Harris's ヘマトキシレン染色液に浸し30分~
1時間染色した。染色後水道水中に30分以上放置発色させた。発色後エタノ
ール系列(70%, 80%, 85%, 90%, 95% 溶液に各々3分間浸潤後、100%
溶液に3分3回浸潤)で脱水、キシロール系列(フェノール/キシロ-ル(1:1)溶液5分
間、キシロ-ル3分間2回浸潤)で透徹後、封入剤(Entellan neu, MERCK)で封
入しプレパラートを作製し、検鏡して溶解窓を観察した。

また、抗ラット h-PA ウサギ抗体(10 µg/ml、第3章 方法①参照)、抗
ヒト melanomat-PA ヤギ抗体(5 µg/ml、American Diagnostica、#387)、
抗ヒト UK 抗体(1:1000, MBL)を含む fibrin film を作製して同様の操作
を行い溶解窓の有無を観察した。

【結果】

① 肝硬変ラットの作製

Phenobarbitone 水投与及び四塩化炭素吸入を行った硬変群ラットと、同期間
蒸留水で飼育を行ったコントロールラットでは体重増加率に顕著な差は認めら
れなかった。硬変群ラットでは第7週目前後より皮膚の黄変がコントロールラ
ット比して顕著になり、眼周囲炎も観察された。

第11週の四塩化炭素吸入3日後のラットの生存率は50%となり、この時
点で硬変群ラットを屠殺し、実験に供した。硬変群ラットのほとんど全てに腹
水の貯留が観察され、肝臓は腫大して脂肪肝様の変性を示した。また、硬変群
ラットの血漿はコントロールラットのそれに比し乳白色を呈していた。

硬変群ラットおよびコントロールラットの体重、肝重量・体重比、肝 pro-
line, hydroxyproline 含量を Fig. 5-2 に示したが、体重は硬変群で若干減少
しており、肝重量(control = 14.2 g ± 0.7 g, cirrhosis = 19.2 g ± 1.7

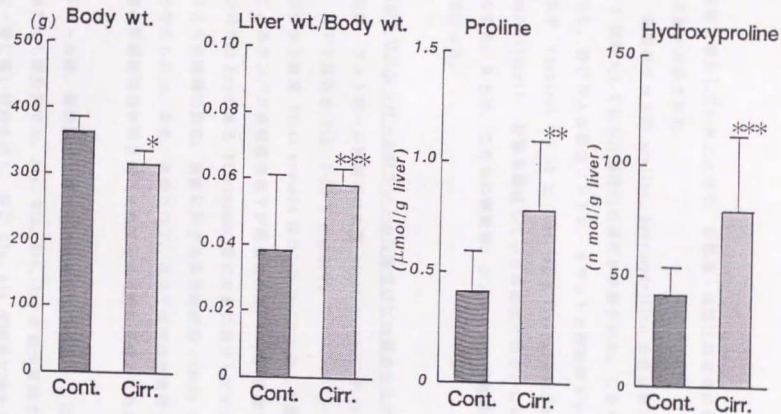


Fig. 5-2. Comparison of the body weight, liver weight, proline and hydroxyproline contents in the liver between control rats and cirrhotic rats.
(values are means \pm S.D., $n=7$, * $p<0.01$, ** $p<0.05$, *** $p<0.001$)

g) が有意に増大していたことから、肝重量・体重比は有意に増大し、硬変群ラット肝の腫大が示された。

また、硬変群ラット肝 proline, hydroxyproline 含量は各々コントロールに比し約 2 倍増大しており肝線維化の進行が示唆された。しかし、Table 5-1 に示すように、肝 DNA 含量はコントロールラットと硬変群ラットで有意な差は認められず (control = 3.05 ± 1.88 (mg/g liver), cirrhosis = 2.60 ± 0.69 (mg/g liver))、肝臓を構成している細胞数そのものには変化はないものと考えられた。さらに、これらの硬変群、コントロール群両者の肝機能について検討を行った。

② 硬変群及びコントロール群ラットの肝臓並びに血液の生化学的検討

肝硬変群、コントロール群両者の血漿 total protein, fibrinogen 量、血清 GOT、GPT 活性を Fig. 5-3, 5-4 に示す。

硬変群ラット血漿 total protein はコントロールに比し有意に減少し、肝機能障害によるタンパク合成能の低下が推察された。一方、肝臓で合成される急性期タンパクの 1 つである fibrinogen 量は有意に増大していた。これは四塩化炭素による肝組織の壊死、炎症に対する急性期反応 (acute phase reaction) であると考えられた。また、血清 GOT、GPT 活性は硬変群で共に著増しており重度の肝機能障害が引き起こされている可能性が考えられた。

コントロール群、硬変群の血清アミノ酸濃度は Table 5-2 に示した。コントロール群に比し硬変群では、Asp, Gln, His, Arg が減少傾向であったが他のアミノ酸は一樣に高い傾向を示し、特に Glu, Ala が顕著に増大した。

分岐鎖アミノ酸 (branched amino acids, BCAA ; Leu, Ile, Val) と芳香族アミノ酸 (aromatic amino acids, AAA ; Tyr, Phe,) の比、すなわち Fischer 比はコントロール群 3.36, 硬変群 3.27 であり両群で有意差は認められなかった。

Table 5-1. DNA contents of control and cirrhotic rat liver.

	DNA content (mg/g of liver)	
	n	mean \pm S.D.
Control Rat	7	3.05 \pm 1.88
Cirrhotic Rat	7	2.60 \pm 2.27

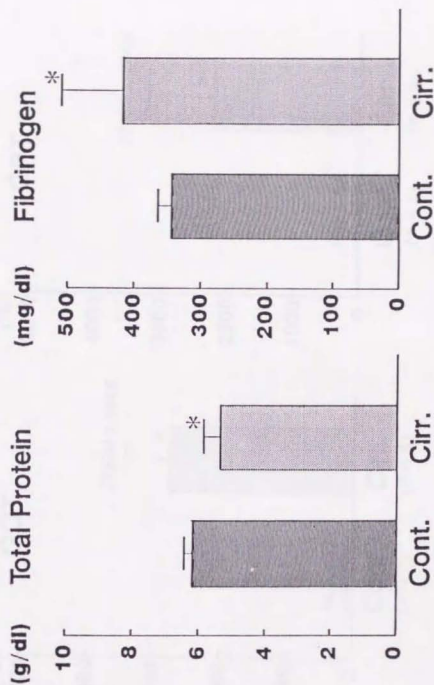


Fig. 5-3. Comparison of the total plasma protein and fibrinogen levels between control rats and cirrhotic rats. (values are means \pm S.D., $n=7$, $p<0.01$)

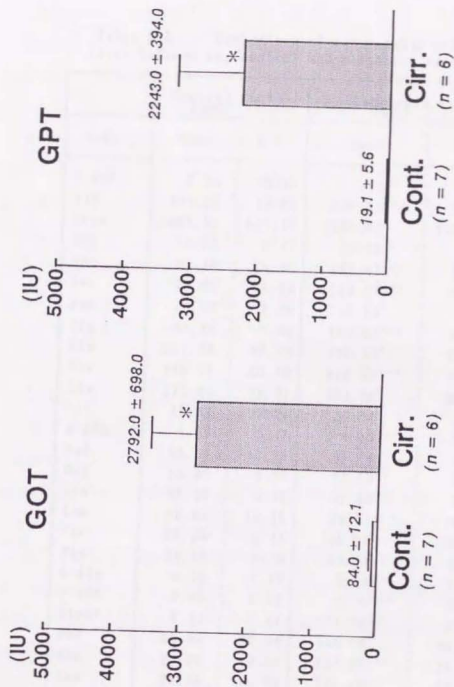


Fig. 5-4. Comparison of GOT and GPT activities between control and cirrhotic rats. (values are means \pm S.D., * $p < 0.001$)

Table 5-2. Comparison of serum amino acid level between the control and cirrhotic rats.

A.A.	Control (n=7) (mM)		Cirrhosis (n=7) (mM)	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.
P-Ser	2.65	0.39	2.42	0.68
TAU	107.20	12.62	205.31***	32.49
Urea	2087.22	519.10	3625.93	1759.88
Asp	19.22	2.17	15.43	7.68
Thr	93.16	15.49	152.47***	19.30
Ser	75.96	14.22	119.37***	15.72
Asn	13.50	2.36	19.16*	5.54
Glu	82.30	9.20	166.62***	28.16
Gln	211.68	48.33	195.92***	55.25
Gly	146.71	30.55	226.53***	36.99
Ala	175.60	32.21	391.98***	80.21
Cit	18.87	3.21	20.86***	4.76
α -ABA	1.39	0.42	4.79**	2.06
Val	63.81	16.55	97.14***	8.47
Met	13.62	3.30	23.49**	5.32
Ile	32.43	6.92	53.76***	5.61
Leu	52.64	16.45	88.81***	9.44
Tyr	22.35	5.44	35.08*	10.36
Phe	21.86	4.79	38.22**	8.51
b-Ala	0.70	1.10	8.52***	3.90
γ -ABA	0.83	2.04	2.30***	3.36
ETONH	5.14	0.84	11.34***	2.54
NH ₃	86.87	20.04	146.26**	34.56
Orn	70.00	10.23	122.50***	18.50
Lys	84.55	19.03	146.96**	36.67
1MHis	1.84	0.80	8.53**	4.58
His	19.22	3.00	11.30***	35.89
3MHis	1.5	0.58	3.64*	1.88
Arg	11.46	10.37	1.13*	1.32

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

③ Zymography による血漿線溶活性の測定

コントロール群、硬変群ラット両者の血中線溶活性は、血漿より調製した euglobulin 分画について zymography を行い検討した。その結果 Fig. 5-5 に示するような zymogram を得た。一番右側のレーンは UK を、一番左側のレーンは初代培養肝細胞培養液を泳動したものである。コントロールラットと硬変群ラットを比較すると、h-P A と同一の位置に泳動される血漿中 P A は硬変群で増大していた。さらに分子量 100 k、や 100 k 以上に泳動される線溶活性が観察されるが、これらは硬変群で顕著に増大していた。さらに 100 k に泳動される線溶活性は plasminogen-free fibrinogen を用いた zymography においても線溶活性を示したことから、fibrinogen を基質として直接分解する protease であると考えられた。

④ 硬変群及びコントロール群ラット肝臓の組織学的検討

1) 肝組織像の検討

硬変群、コントロール群ラットについて血中パラメーターの測定による肝機能評価のみならず、両者の肝臓について組織学的検討を行った。

Fig. 5-6 にコントロールラット肝組織のアザン・マロリー染色像を示した。

上側の写真は肝組織の弱拡大像で、静脈や、周囲に実質細胞が放射状に配列した中心静脈が観察される。下側の写真はグリソン鞘周囲の強拡大像を示す。静脈、動脈、胆管から構成されるグリソン鞘と周囲に規則正しく配列した実質細胞が観察される。

一方、Fig. 5-7 は硬変群ラット肝のアザン・マロリー染色による組織像を示す（上側；弱拡大像、B；強拡大像）。コントロールラットに比べ暗青色に染色される collagen fiber が観察される。さらに発達した collagen fiber 同士が接触して形成された偽小葉も観察される。



Fig. 5-5. Zymography of PA in auglobulin fraction obtained from control and cirrhotic rats.



Fig. 5-5. Zymography of PA in euglobulin fraction obtained from control and cirrhotic rats.

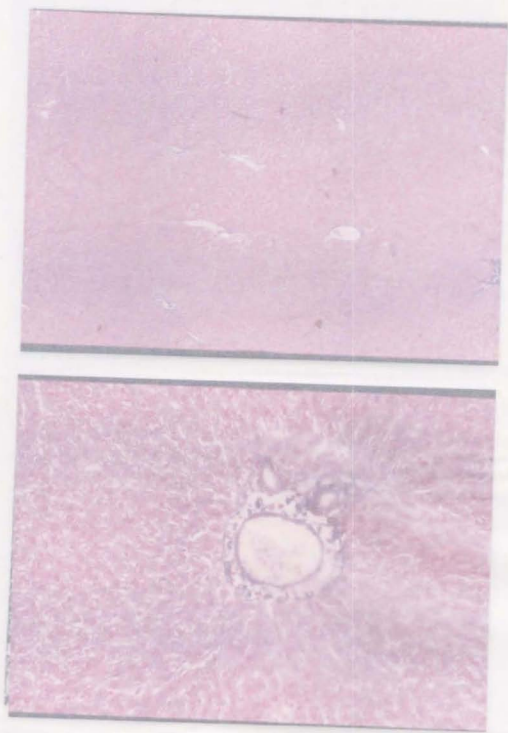


Fig. 5-6. Histological staining of control rat liver specimens.
Upper panel, Mallory-Azan staining, x 40.
Lower panel, Mallory-Azan staining, x 190.

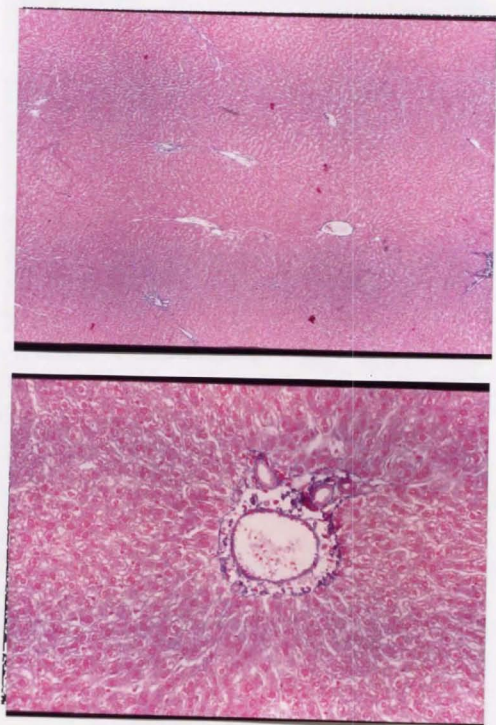


Fig. 5-6. Histological staining of control rat liver specimens.
Upper panel, Mallory-Azan staining, x 40.
Lower panel, Mallory-Azan staining, x 190.

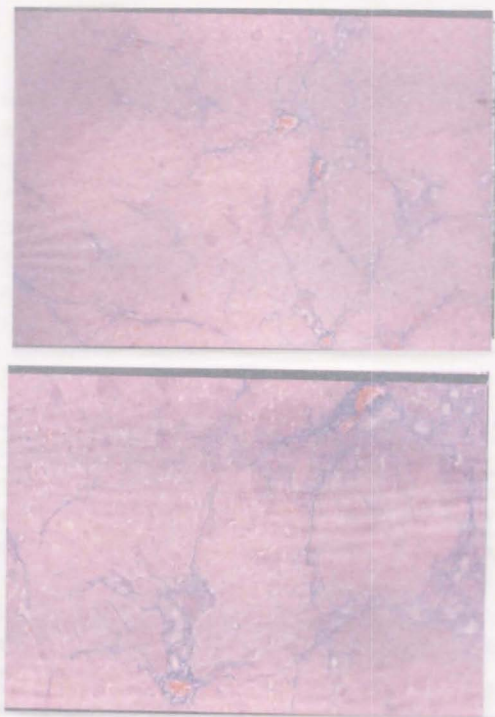


Fig. 5-7. Histological staining of cirrhotic rat liver specimens.

Upper panel, Mallory-Azan staining, x 40.

Lower panel, Mallory-Azan staining, x 190.

Microphotograph reveals fibrosis and pseudo-lobule formation. In scattered areas, hepatocytes appear to have lost their nuclei, and blood pigment can be seen between dissociated hepatocytes.

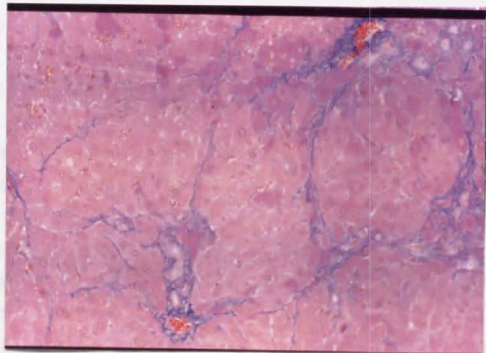
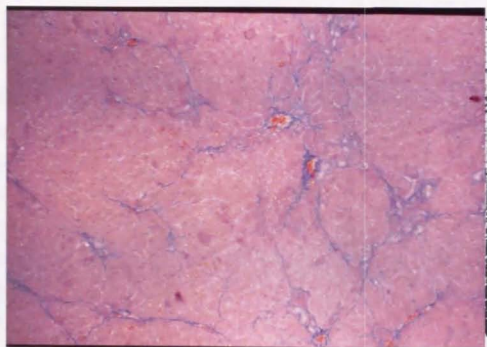


Fig. 5-7. Histological staining of cirrhotic rat liver specimens.

Upper panel, Mallory-Azan staining, x 40.

Lower panel, Mallory-Azan staining, x 190.

Microphotograph reveals fibrosis and pseudo-lobule formation. In scattered areas, hepatocytes appear to have lost their nuclei, and blood pigment can be seen between dissociated hepatocytes.

実質細胞の細胞像は形態がコントロールに比し偏平であり、配列にも規則性が見られず染色性も正常肝細胞とは異なっている。また、核の異常も多く、脱核した細胞や逆に核の濃縮像も認められた。さらに実質細胞間への出血像が観察される。

これまでの生化学的な肝機能の検討の結果や肝組織像の検討結果から、四塩化炭素蒸気吸入により作製した肝障害ラットは典型的な肝硬変初期像を呈した。これらの肝硬変ラットのh-P Aについて fibrinolysis autography によりコントロールラットのそれと比較検討した。

2) 肝 P A 活性の検討

コントロール及び硬変群ラット肝臓の P A 活性を Todd の fibrinolysis autography 法により検討した。

コントロールラット肝臓の fibrinolysis autography を Fig. 5-8 に示す。正常ラット肝では、一部血管周囲に微弱な fibrin 分解活性を認めた所見もあるが、ほとんどの検体において fibrin 分解活性は認められなかった。

一方、肝硬変群ラット肝の fibrinolysis autography は (Fig. 5-9, Fig. 5-10) はグリソン鞘周囲、特に細胆管周囲と一致して明瞭な fibrin 分解活性が観察され、肝硬変時に肝において P A 活性が亢進していることが明らかとなった。

さらに、これらの肝硬変時に亢進している P A 活性は抗 h-P A 抗体 (10 μ g/ml)、抗ヒト melanoma t-P A ヤギ抗体 (5 μ g/ml) により完全に抑制されたが、抗ヒト U K 抗体 (1:1000) は何等影響を与えなかった。

このことから硬変肝臓に顕著に見いだされる P A 活性は、U K とは免疫学的に異なり、初代培養肝細胞が産生する h-P A と同一の P A によるものであることが確認された。

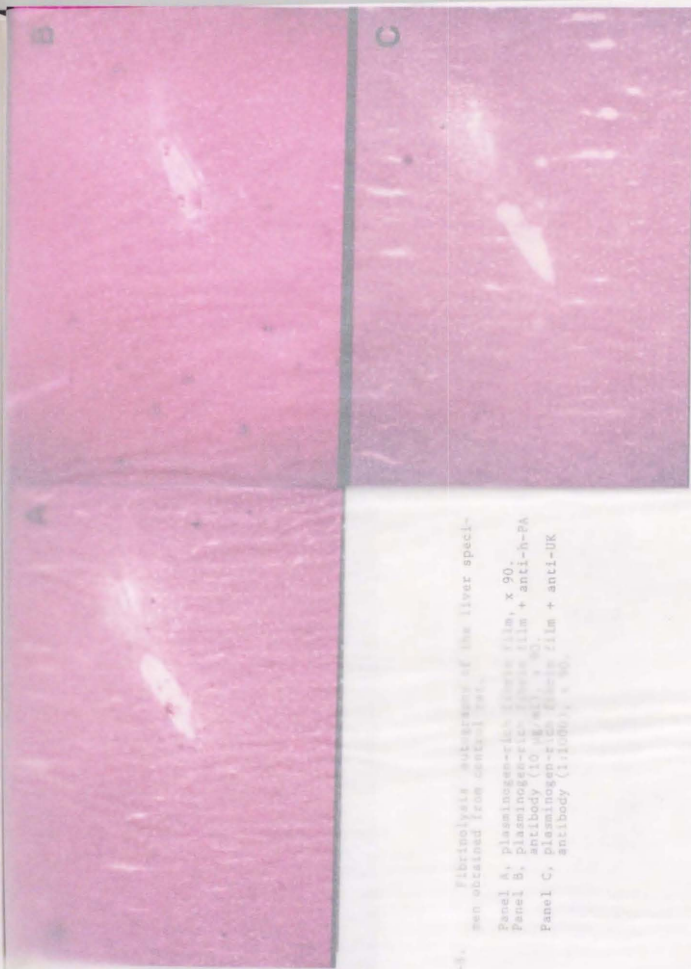


Fig. 3-8. Fibrinolysis autographs of the liver specimens obtained from control rat.

Panel A, plasminogen- α_2 fibrin film, x 90.

Panel B, plasminogen- α_2 fibrin film + anti-h-PA antibody (10 μ g/ml), x 90.

Panel C, plasminogen- α_2 fibrin film + anti-UK antibody (1:100), x 90.

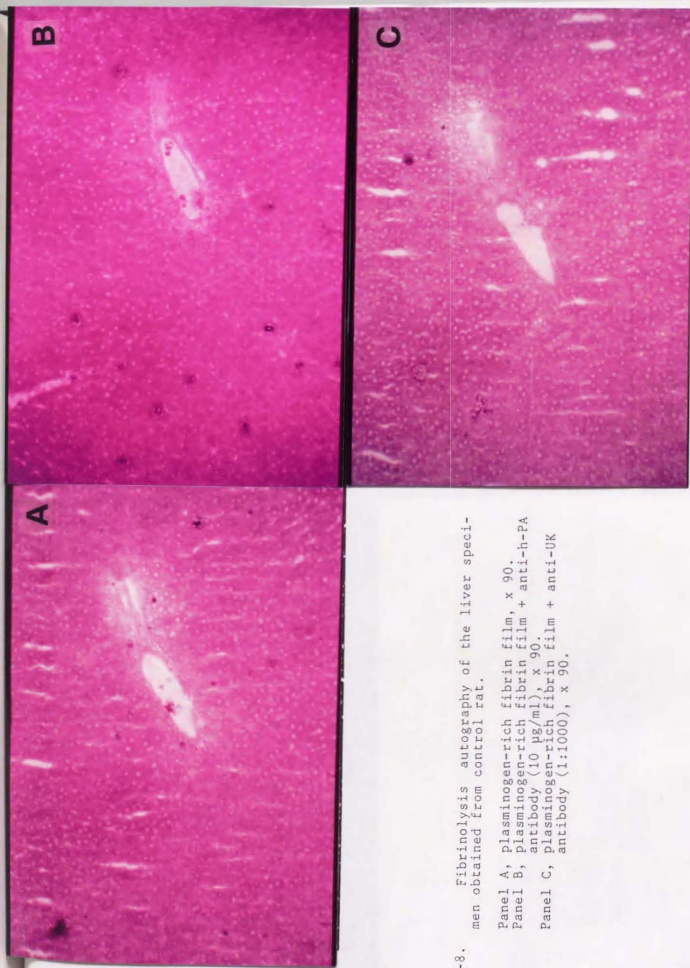


Fig. 5-8. Fibrinolysis autoradiography of the liver specimens obtained from control rat.

Panel A, plasminogen-rich fibrin film, x 90.

Panel B, plasminogen-rich fibrin film + anti-h-PA antibody (10 $\mu\text{g/ml}$), x 90.

Panel C, plasminogen-rich fibrin film + anti-UK antibody (1:1000), x 90.



Fig. 5-9. Fibrinolysis autoradiography of the liver specimens obtained from cirrhotic rat.

Panel A, plasminogen-rich fibrin film, x 90.

Panel B, plasminogen-rich fibrin film + anti-PA antibody (10 μ g/ml), x 90.

Panel C, plasminogen-rich fibrin film + anti-UK antibody (1:1000), x 90.

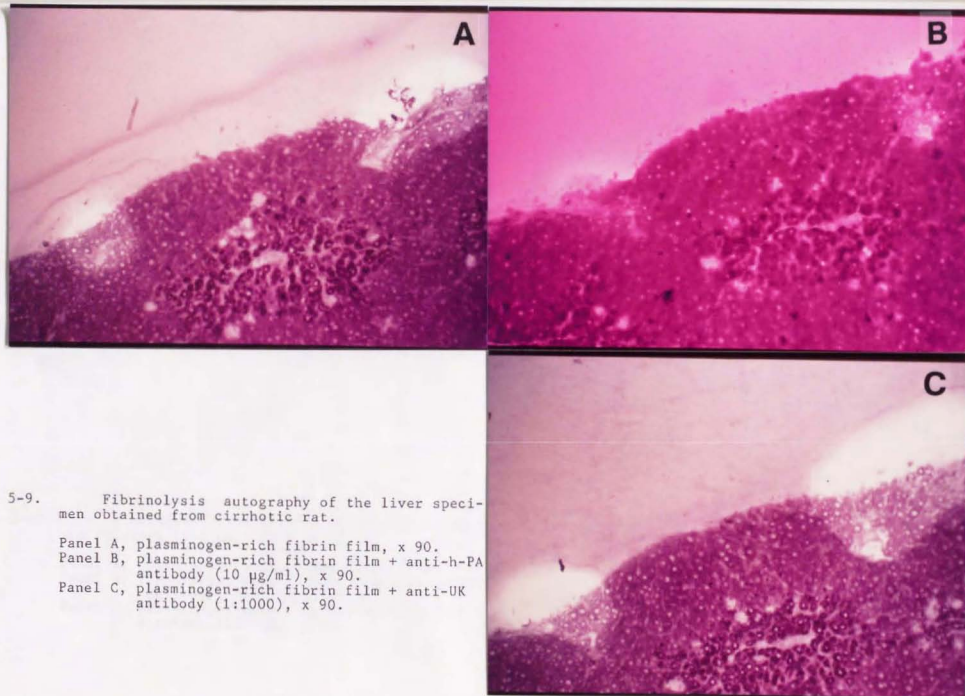


Fig. 5-9. Fibrinolysis autography of the liver specimen obtained from cirrhotic rat.

Panel A, plasminogen-rich fibrin film, x 90.

Panel B, plasminogen-rich fibrin film + anti-h-PA antibody (10 µg/ml), x 90.

Panel C, plasminogen-rich fibrin film + anti-UK antibody (1:1000), x 90.

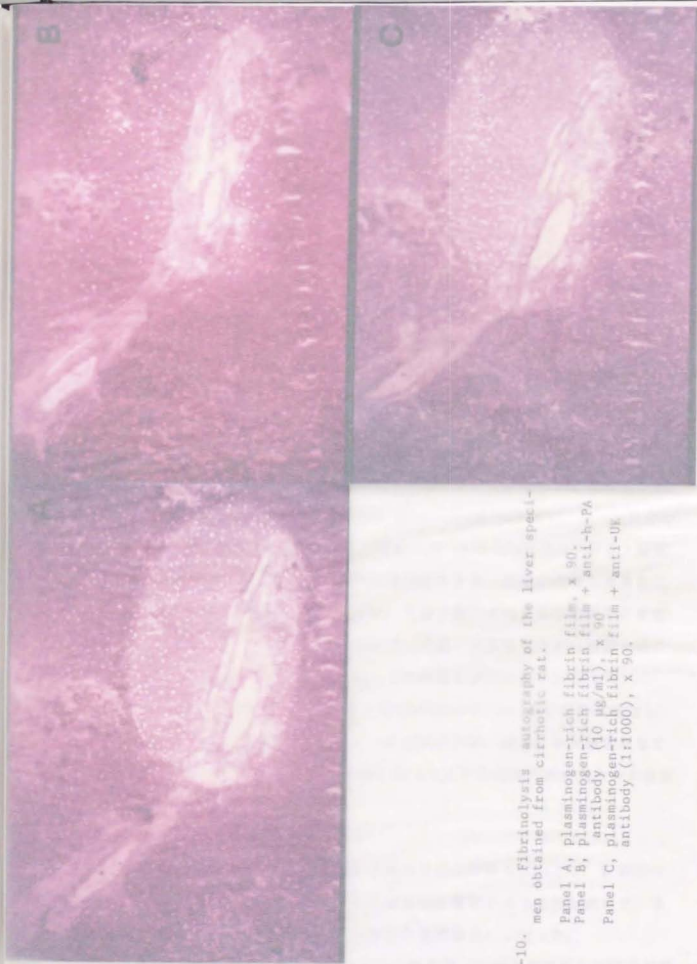


Fig. 5-10. Fibrinolysis autoradiography of the liver specimens obtained from cirrhotic rat.

Panel A, plasminogen-rich fibrin film, x 90.

Panel B, plasminogen-rich fibrin film + anti-B-PA antibody (10 µg/ml), x 90.

Panel C, plasminogen-rich fibrin film + anti-UK antibody (1:1000), x 90.

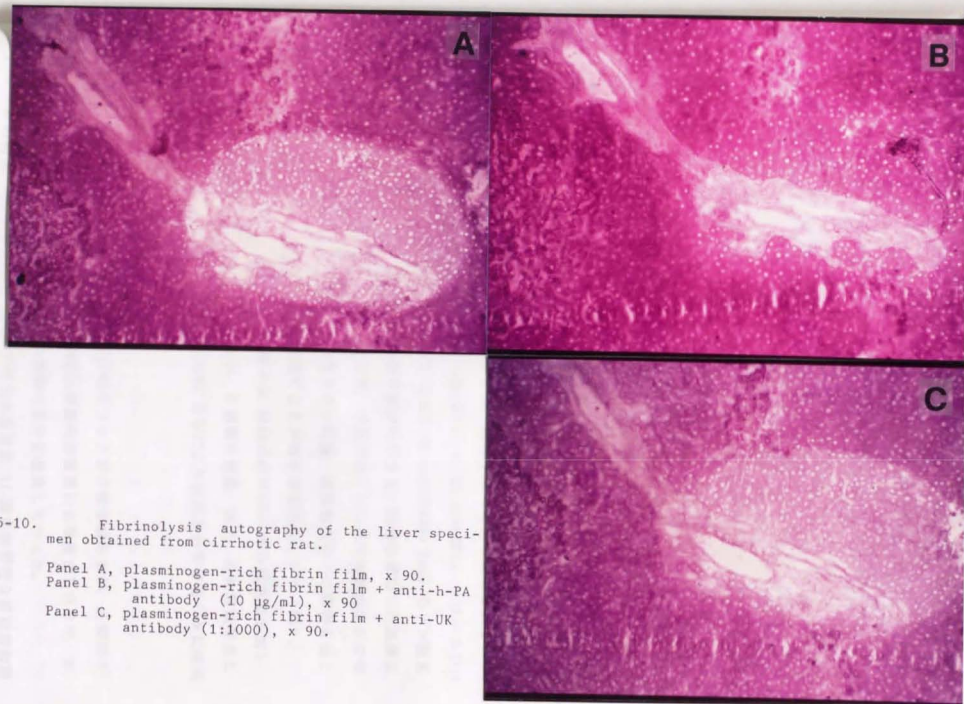


Fig. 5-10. Fibrinolysis autoradiography of the liver specimen obtained from cirrhotic rat.

- Panel A, plasminogen-rich fibrin film, x 90.
- Panel B, plasminogen-rich fibrin film + anti-h-PA antibody (10 µg/ml), x 90.
- Panel C, plasminogen-rich fibrin film + anti-UK antibody (1:1000), x 90.

【考察】

本章ではh-P Aの生理的・病態生理的役割を検討する目的で、実験的肝障害、特に肝硬変ラットを作製し、肝硬変ラットのh-P A活性について検討した。

肝硬変は世界的に見て頻度が高く、疾患モデルの研究の歴史も古い。肝硬変モデル動物の作製は一般的に肝細胞を傷害する CCl_4 、D-galactosamine 等の薬物、あるいは実験食を用いて作製するが、自然発症をみた肝硬変動物の分離は未だに成功していない。肝硬変ラットの作製は、McLean ら (91) の四塩化炭素蒸気吸入法に基づいて行った。

四塩化炭素による肝障害は、四塩化炭素が肝細胞の滑面小胞体で代謝され、障害惹起物質に変換されてから肝障害を引き起こすことが明らかにされている。すなわち薬物代謝系酵素により CCl_4 は $\text{CCl}_3\cdot$ と $\text{Cl}\cdot$ に分解し、フリーラジカルをもつ $\text{CCl}_3\cdot$ が共有電子を介して、主として cytochrome P_{450} のリン脂質部分と反応し、その結果、薬物の水解作用が低下する。同時に増加した過酸化脂質が小胞体をはじめ、ミトコンドリア、ゴルジ体、さらには細胞膜等の変性・破壊を招き、タンパク質合成、エネルギー代謝、脂質酸化などの障害を起こし脂肪変化、肝細胞壊死、線維化を招くことが明らかにされている (96)。

McLean らは薬物代謝系酵素を誘導する phenobarbitone を飲用水に添加し CCl_4 吸入を週 2 回、1 回 20 分行い、4 週後に脾腫、腹水、辜丸萎縮等をとまなう肝硬変を作製し、phenobarbitone 投与により肝硬変作製が明らかに促進されるという結果を得ている。

著者らは McLean らの原報通りに肝硬変ラットの作製を試みたが、肝硬変ラットの作製を見る前にほとんどのラットが急性肝障害により死亡したので、本研究では四塩化炭素蒸気吸入条件を温和な条件に改良して行った。

その結果、週 1 回の四塩化炭素蒸気吸入開始後 11 週に典型的な肝硬変初期

像を呈するラットを作製することができた。この肝硬変ラットの体重増加率並びに肝DNA量はコントロールラットとほとんど変化なかったが、肝重量/体重比、肝 proline, hydroxyproline 含量は有意に増大しており、肝の腫大ならびに線維化の進行が示唆された。

硬変群ラット血漿 total protein はコントロールに比し、有意に減少し肝細胞障害によるタンパク合成能の低下が原因と推定された。

一方、血漿 fibrinogen 量は有意に増大していた。fibrinogen は主として肝細胞で合成され、劇症肝炎や非代償性肝硬変等の重篤な肝実質障害時に血レベルが低下するが、組織障害、炎症、悪性腫瘍の存在時には上昇が見られ、必ずしも肝疾患の重症度を反映しない。さらに、肝癌や肝硬変、急性肝不全で fibrin monomer 重合障害のある異常 fibrinogen がしばしば出現することが知られており、分子中のシアル酸含量の増加との関連が指摘されている(97,98)。硬変群ラット血漿 fibrinogen は有意に増大していたが、これは先に述べた四塩化炭素による肝組織の壊死、炎症に対する急性期反応であると考えられた。

さらに、血清 GOT、GPT 活性は硬変群で共に著増しており重度の肝細胞壊死並びに肝機能障害が引き起こされている可能性が考えられた。

肝臓は、尿素合成や糖新生などアミノ酸代謝に連結する固有の機能を営んでいる。したがって肝機能障害時にはアミノ酸代謝の異常が顕著に認められる。

硬変群の血清アミノ酸濃度はコントロール群に比し、Asp, Gln, His, Arg が減少傾向にあったが他のアミノ酸は一樣に高い傾向を示し、特に Glu, Ala が顕著に増大した。ヒトに関しては、各種肝疾患と血漿アミノ酸濃度の関係についての報告がある(99)。劇症肝炎ではBCAAや Trp 等全てのアミノ酸濃度が増大し、特にAAAや Met は正常値の5~20倍の高値を示す。さらに、肝硬変の場合BCAA濃度が減少するより早い時期から、Tyr, Phe などのAAA濃度と Met が高値を示すことが多く、その後の肝病態の進展とともにBCAA

の低下が加わり、BCAA/AAAの低下が顕著となることが明らかにされている。今回作製したラット肝硬変の場合は血漿中のほとんどのアミノ酸濃度が増大したが、ヒト肝硬変で観察されたAAA、やMetの顕著な増大は認められず、Fischer比もコントロール群3.36、硬変群3.27であり両群で有意差は認められなかった。

一方、硬変群ラットでは血中線溶活性がコントロールラットに比べ明らかに増大していた。

コントロールラットの血漿より調製したeuglobulin分画について行ったzymographyは分子量60kのh-PAと同一の位置に泳動されるPAと100kのfibrin分解活性が認められた。硬変群ラット血漿のeuglobulin分画のzymogramはコントロールラットで観察された2種のfibrin分解活性の他に、より高分子の位置に複数のfibrin分解活性が観察された。これらの活性分子の本態については明らかでないが、肝硬変時に血中線溶活性が増大していることがPA分子種の増加という面から明らかとなった。

ヒトの肝疾患においても一般には重症度に応じて血中PA量は増大することが知られている。PAは主として肝臓で処理除去されることが明らかにされており、動物実験の成績では、肝切除によりも-PAのクリアランスは著しく遅延する(100, 101)。すなわち肝障害時には主としても-PAの肝での処理除去機能(hepatic clearance mechanism)の障害により血中存在量が増大すると考えられており、UKについてもおそらくも-PAと同様の機序で血中で増大するが、肝硬変に比し肝癌でUKは有意に増大していることから、悪性腫瘍の増殖とUKとの関連を示唆する報告もある(102)。

これまでに肝硬変群ラットの病態生化学的検討の結果について述べたが、肝硬変群ラット肝の組織学的検討も行った。肝硬変の形態学的特徴として、びま

ん性の肝細胞障害、線維化、正常な小葉構造の喪失、偽小葉化と再生結節形成等が挙げられる。これらの肝硬変における特徴的な形態変化は結合組織の増生によるものであるが、一般的に組織の壊死、欠損にともなう修復の際には細胞増殖と相まって結合組織の増生が行われ創傷治癒が完成する。肝線維化も長期の炎症壊死後の肝の創傷治癒であり、生理的な防御機構の一つであると考えられる。しかし硬組織の治癒と異なり、肝では結合組織の増生は小葉の改築、脈管系の変化、血流抵抗の増加を引き起こし、非生理的な状態になることが問題である。また肝の炎症壊死が1回のみで終われば線維化を残さず治癒する。つまり肝の線維化は繰り返された組織修復の結果ということができる。これらの結合組織の主成分は collagen であるが、他に elastin, glycosaminoglycan 等も挙げられる。

硬変群ラット肝のアザン・マロリー染色像は、暗青色に染色される collagen fiber が顕著に認められ、さらに発達した collagen fiber 同士が接触して形成された偽小葉が観察された。また、硬変群ラット肝組織の細胞像は形態的にも偏平であり組織構築の規則性も失われていた。さらに、核の濃縮像や出血像が認められた。これらの事実は今回作製した肝硬変ラットが生化学的な肝機能のみならず、肝組織の形態学的特徴からも肝硬変であることが明らかとなった。そこでこれらの硬変肝における h-PA 活性について検討を行った。

肝臓 h-PA 活性は Todd の方法による fibrinolysis autography により検討した。正常ラット肝臓においては fibrin 分解活性はほとんど検出されなかったが、硬変群ラット肝臓はグリソン鞘、特に細胆管周囲と一致して明瞭な fibrin 分解活性が観察された。この fibrin 分解は plasminogen-free fibrin film では観察されないことから PA 活性が増大していることが明らかとなった。さらにこの PA 活性は抗 h-PA 抗体、抗ヒト melanoma t-PA 抗体により抑制されたが、抗 UK 抗体によっては抑制されなかったことから、肝硬変において増大する PA は培養肝実質細胞が産生する h-PA と免疫学的に同一のも

のであることが明らかにされた。

今回、肝硬変時に肝臓で顕著に増大していた h-PA 活性と、血中で増大した PA 活性の関連性については、今後免疫学的な手法を用いての検討が必要である。血中 PA の増大についてみても、肝臓で産生された h-PA の血流中への分泌が考えられるし、肝での PA の処理除去能の低下も考えられる。さらには PA 活性を抑制する因子 (PAI 等) の変動や、全身的な反応機構の変化等も考慮しなければならないだろう。

また、当研究室の有賀らは肝硬変において胆汁中の PA である bilokinase 活性が増大していることを明らかにしている (103)。これらの肝硬変時に増大する h-PA 活性や bilokinase 活性の病態生理的役割については血管新生や既存脈管の血液成分による閉塞に対し、これらの脈管を開通させるものと考えられている以外には明らかでないが、最近、PA が latent collagenase を active collagenase に活性化するという報告もあるので (104)、炎症壊死反応により増生した結合組織除去のための生理的な防御機構への関与も考えられる。

最近、肝再生の中心的役割を果たす hepatotropic な growth factor として HGF (hepatocyte growth factor) が発見された (105)。HGF は血小板中より純化されたが (106, 107)、その主要産生臓器は肺であり、血中濃度は CCl₄ 等による肝障害により上昇し、同時に非実質細胞においても HGF mRNA の顕著な発現が観察され、エンドクラインおよびバラクライン機構で肝再生、増殖を促すと考えられている (108)。HGF の分子構造はクリングル構造を有し plasminogen と高い相同性を示す。また、HGF は肝障害時に血中濃度が増大するのみならず正常肝臓中の細胞外マトリックス (extracellular matrix, ECM) に分子内の heparin 結合部位を介して潜在していることが明らかにされ (109)、肝障害時に増大した h-PA 活性が ECM 結合型の HGF の遊離並び

に活性化に関与していることも考えられるため、肝再生機構とh-P Aとの関連性について現在検討中である。

さらに、U Kが糸球体上皮細胞のDNA合成、細胞増殖を *in vitro* で惹起することが明らかにされ、P Aの増殖因子としての作用も報告されたかことから(110)、h-P Aが肝再生における肝細胞増殖に何等かの関わりを持っている可能性も考えられる。

これまでに述べたように、肝細胞は血液凝固・線溶に関与する数多くのタンパクを合成・分泌している。同時に肝網内系は活性化凝固因子やP Aの処理除去能を有している。肝疾患では、重症度に応じて、血液凝固・線溶因子や阻害因子の合成障害に加えて、P Aのクリアランスの低下、脾機能亢進症による血小板の減少、門脈圧亢進症、さらには凝固因子の質的異常も加味され、複合的止血異常を呈すると考えられる。

本章では肝障害時、特に肝硬変においてh-P Aがドラマチックに増大していることを見だし、h-P Aが肝疾患における全身の凝固・線溶系の異常に関与しているのみならず、肝硬変における結合組織除去の生理的防御機構の1つとして働いている可能性や、肝潜在型HGFの活性化等による肝再生機構への関与というP Aの生理作用の新しい側面について考察した。

総合討論

本論文において著者は、肝がPAを産生することを初代培養肝細胞を用いて明らかにした。この初代培養肝細胞が産生するPAを、肝が産生するPAという意味で hepatic plasminogen activator, h-PAと命名した。

これまでのPAの組織局在に関する研究は、肝にPAは局在しない、もしくは極めて僅かのPAしか存在しないことを示した。これらの臓器 homogenate のPA活性を指標とした検討では、肝臓のように線溶系酵素の inhibitor を多量に産生している臓器では、PAの存在が見落とされてしまったことが原因と考えられる。

まず肝実質細胞の無血清培地を用いた初代培養系を確立し、培養液中へのPAの産生を standard fibrin plate 法や zymography により、肝細胞のPAの局在性を Todd らの fibrinolysis autography により確認した。肝細胞は EGF, insulin, glucagon, cAMP を添加した WILLIAM'S E を用いて初代培養すると、UK換算で $5 \sim 10$ IU/ 10^5 cells/24 hr の h-PA を産生した。

Kruithof らは、insulin, transferin, progesteron, cortisole, aprotinin を添加した無血清培地で melanoma 細胞培養系を確立し、40 IU/day/ml の t-PA 産生を見たと報告しているが (110)、初代培養肝細胞は melanoma 細胞と同程度あるいはそれ以上のPA産生能を有していると考えられる。

初代培養肝細胞培養液中に産生された h-PA について精製法を確立すると共に、h-PA のタンパク化学的、酵素学的性質をはじめて明らかにした。

h-PA は CM-Sepharose, Arginine-Sepharose, Benzamidine-Sepharose, を用いた精製法により単一にまで純化された。しかしながら、本研究で行った

培養・精製のスケールではh-PAのタンパク質としての実体を把握するに足りる量が得られず、一次構造や構造と機能の関係を明らかにするには至らなかった。現在、一般的に組織型PA (t-PA) の生理学的機能・作用に関する研究を行うのに必要なt-PAを調製するのにも、t-PAを多量に産生する株化細胞、すなわち melanoma 細胞等由来のt-PAや、recombinant t-PAに頼らざるを得ないのが現状である。同様にh-PAの詳細な構造や機能の検討を行うには、今後、初代培養肝細胞による高収量のh-PA産生系の確立や遺伝子工学的手法を用いた recombinant h-PA産生法の確立が必要であると考えている。

精製h-PA標品を用いてh-PAの諸性質を明らかにした (Table D-1)。h-PAは、アルカリ側に等電点を有する塩基性タンパク質であり、分子量は約 60 k と算出された。h-PA活性は中性付近で最も安定で、至適pHは8.0、熱には比較的不安定な酵素であった。精製においては、等電点から理解されるように、塩基性タンパクであるが故に CM-Sepharose 等の陽イオン交換体

Table D-1. Characteristics of h-PA

<u>Physicochemical</u>	<u>Enzymatic</u>
Molecular Weight ~ 60 k (SDS-PAGE)	Optimal pH pH = 8.0 (S-2288)
Isoelectric point pH = 8.7, 8.9, 9.0, 9.2 (Isoelectrofocusing)	Thermostability Stable at 37 °C Labile at 80 °C
	Hydrolysis : S-2288 Km = 0.36×10^{-4} M
	Fibrin affinity High

によく吸着された。また、Arginine, p-aminobenzamidine を ligand した担体に強固に保持されたことから、活性型の serine protease であると考えられた。

精製 h-P A 標品の standard fibrin plate 法や parabolic assay における基質分解能は、U K とほぼ同様で顕著な差は認められず、plasminogen の活性化に関して両者の性質に差がないものと考えられた。

h-P A の各種合成基質分解能は、組織型 P A 特異合成基質 S-2288 を良く分解し、S-2288 に対する K_m 値は $0.36 \times 10^{-4} M$ と算出されたが、U K 特異合成基質 S-2444 は分解しなかった。さらに、parabolic assay において fibrinogen の臭化シアン分解物である stimulator により h-P A 活性が増強されたこと、fibrin を ligand した担体に h-P A は強固に保持されたことから、h-P A は U K とは異なる組織型の P A に属するものであると考えられた。

h-P A の免疫学的性質を検討するために抗 h-P A ウサギ抗体を作成し、h-P A と他の組織 P A、U K などとの免疫学的性質を比較検討した。

抗 h-P A 抗体は h-P A 活性を抑制し、B K 活性も同様に抑制したが、U K 活性には何等影響を及ぼさなかった。また、肺、腎臓、卵巣、子宮由来の P A 活性を 86~39 % 阻害した。このことは、h-P A と B K が同一の抗原性を有すること、h-P A は他の組織 P A と免疫学的相同性を示すが、U K とは異なる抗原性を有することを示している。以上の h-P A のタンパク質化学的・酵素学的性質、免疫学的性質の検討の結果は、h-P A と B K が同一のものであること、肝実質細胞で産生された h-P A が胆汁内に分泌されていることを示唆している。そこで、肝胆系における P A 産生調節機構を検討する目的で初代培養肝細胞の h-P A 産生に及ぼす、ホルモンや血液凝固線溶関連物質の影響について検討した。

初代培養肝細胞系はホルモン応答能をはじめとする肝機能を *in vivo* とほぼ

同様に有する系であると考えられている。そこで初代培養肝細胞を用いた h-P A 産生測定系を確立し、種々の物質の h-P A 産生に及ぼす影響について検討した。

その結果、初代培養肝細胞系における h-P A 産生は insulin や EGF により影響を受けなかったが、epinephrine や glucagon により増大した。また、h-P A の産生は、cAMP phosphodiesterase の inhibitor や adenylate cyclase activator 等の細胞内 cAMP 濃度を増大させる物質により増大し、これらの薬剤やホルモンによる h-P A 産生の増大機構に cAMP 情報伝達系の関与が示唆された。事実、h-P A 産生の増大は細胞内 cAMP 濃度上昇とよく相関し、さらに、cAMP 誘導体 (dibutyl cAMP) の処理によっても h-P A 産生は濃度依存的に増大した。

cAMP による h-P A 産生増大は cAMP dependent protein kinase の inhibitor, actinomycin D, cycloheximide により抑制されたことから、h-P A 産生に cAMP dependent protein kinase や mRNA 合成、タンパク合成系が関与していると考えられた (Fig. D-1)。

ある種の fibrin 分解産物 (FDP) は h-P A 産生を増大させた。しかしながら FDP による h-P A 産生増大は、細胞内 cAMP 濃度の増大を伴わず、C-kinase の inhibitor, H-7 によっても抑制されなかった。このことは、FDP による h-P A 産生増大が cAMP, A-kinase 系を介した glucagon, epinephrine 等による産生増大とは異なる機序で惹起されていることを示しており、今後検討が必要であると考えられる (Fig. D-2)。

Dexamethasone は h-P A 産生を強力に抑制した。Dexamethasone は肝細胞における plasminogen activator inhibitor (PAI) の産生を誘導することが知られている (80,81)。しかしながら、初代培養肝細胞においては dexamethasone により PAI を含めた fibrinolytic inhibitor の誘導は観察されず、h-P A 産生そのものが dexamethasone により抑制されていることが明らかに

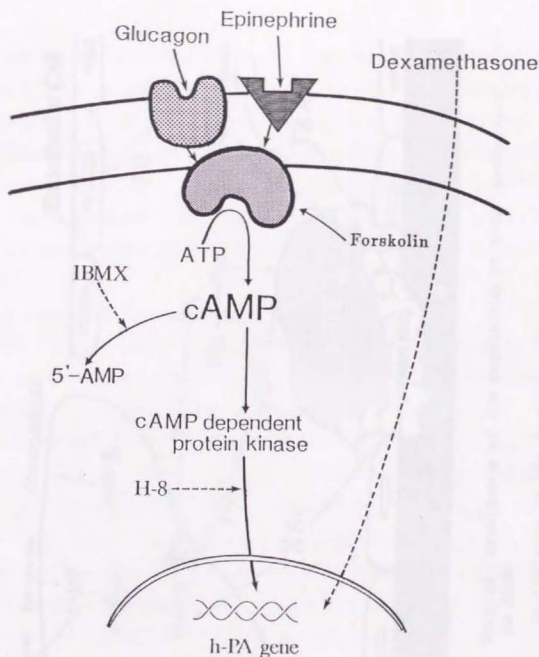


Fig. D-1. Schematic representation of the regulation of h-PA production by rat hepatocytes in primary culture. (—, Stimulatory; ---, Inhibitory)

h-PA production was augmented by the hormones and agents, which increase the level of intracellular cAMP or cAMP analogue, whereas it was decreased by dexamethasone. The augmentation was suppressed by H-8, actinomycin D and cycloheximide, suggesting that the cAMP dependent protein kinase (A-kinase) activity and protein synthesis system would be responsible for the augmentation.

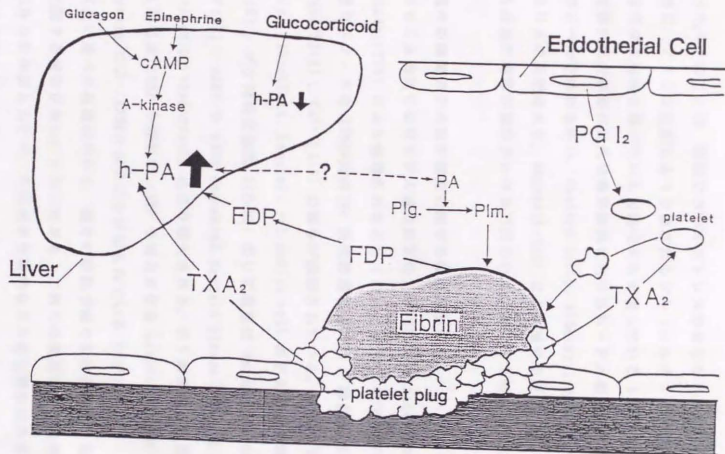


Fig. D-2. Working hypothesis of the regulation of h-PA production in vivo.

In addition to the hormonal stimulation, h-PA production by the liver may be stimulated by the products of coagulation and fibrinolytic systems.

なった。このことは、生体においてストレスのともなう外傷、手術等による出血時に、ストレス反応により分泌されるグルココルチコイドが線溶系を抑制し、血栓形成を有利に導いている可能性をも示唆している (Fig. D-1, D-2)。

当研究室の深澤は初代培養肝細胞における h -PA 産生調節機構について遺伝子レベルで検討を行い、cholera toxin, dibutyryl cAMP により h -PA mRNA の発現増大を、dexamethasone により減少を認め、肝における h -PA 産生の調節が遺伝子レベルで行われていることを明らかにした (111)。

種々の細胞の PA 産生調節に関する報告は多い。

HeLa 細胞における PA 産生は EGF や 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) により誘導されること (112)、TPA による誘導にはアラキドン酸カスケードの lipooxygenase 系代謝産物 (113)、細胞外 Na^+ , Na^+ / K^+ -ATPase (114)、 Ca^{2+} (115) の関与が推察されている。また、TPA は Chick embryo fibroblast, hamster, rat embryo cell の PA 産生を増大させる (116)。ブタ腎株化細胞 LLC-PK₁ の UK 産生は dexamethasone により抑制される (117)、cAMP や cAMP dependent protein kinase の活性化 (118)、calcitonin, vasopressin により増大される。ヒト臍帯静脈内皮細胞の t -PA 産生は cAMP や細胞内 cAMP を増大させる agonist により (119)、また butyrate により抑制されることが知られている (120)。

以上に述べた細胞以外にも、種々の細胞で様々な物質の PA 産生に及ぼす影響に関する報告がある。しかしながら、これらの報告は癌化細胞や株化細胞を用いたものがほとんどで、生体内の生理的な PA 産生調節機構の理解に結び付くものは少ない。

本研究では、ホルモン応答能をはじめとする肝機能を *in vivo* とほぼ同様に有すると考えられる初代培養肝細胞を用いて、 h -PA 産生調節機構について検討し、 h -PA 産生が cAMP や cAMP を second messenger として働く特定

のホルモン、fibrin 分解産物により増大し、dexamethasone により減少することをはじめて明らかにした (67)。

今後は、灌流肝臓等の in situ 実験系や、より in vivo に近い実験系での h-P A 産生について検討を行うと共に、h-P A 産生を生理的に調節している物質の検索、特定を行いたいと考えている。

先に述べた様に、P A の生理作用については plasminogen の活性化を介した作用、つまり線溶や、癌の浸潤・転移、排卵等についてのみ知られているに過ぎず、P A そのものについての生理作用や存在意義に関してはほとんど明らかにされてない。そこで本論文では肝臓に見いだした P A、h-P A の in vivo における生理的ないし病態生理的意義の一端を明らかにする目的で、実験的肝硬変ラットにおける肝組織内 h-P A 局在について fibrinolysis autography により検討した。

その結果、コントロールラット肝臓においてはどの部位もほとんど活性を示さなかったが、硬変肝組織ではグリソン鞘周囲、特に胆肝周囲に顕著な活性局在を示した。硬変肝組織で増大を認めたこの活性は、抗 h-P A 抗体により完全に抑制されたことから、初代培養肝細胞が産生する h-P A と免疫学的に同一な分子によるものであることが明らかとなった。肝硬変症においては、肝臓における P A のクリアランス能の低下、P A I 産生能の低下により血中 P A 活性が増大し線溶亢進状態を招くとされている (121)。

本論文では、硬変肝組織において h-P A 活性が増大しているという肝線溶系の新しい局面を見いだすことができ、その作用について考察した。

今後、硬変肝組織で増大を認めた、h-P A の生理的、病態生理的役割についてさらに検討を行わねばならないが、h-P A が in vivo において肝臓の生理や病態と密接に関連していることが示唆された。

近年、肝臓が血中 P A の除去器官として注目されており、肝での t-P A と

UKを認識する2種類の受容体の存在(122)、 t -PA・PAI複合体を認識する受容体が存在する可能性(123)、recombinant t -PAが単離肝細胞にcoated pitにより内部化(internalization)されること(124)、 t -PAがHep G₂細胞においてreceptorを介したendocytosisを受けること(125)、肝における t -PAの取り込みがmannose receptor, galactose receptorを介して行われている可能性(126)等が報告されている。

これらの報告と本研究の結果を合わせて考えると、肝臓はPAの産生臓器であると同時に、クリアランスを担う臓器でもあり、PAに関して産生と代謝の2面性を有する唯一の臓器であるといえよう。

肝臓は、抗体を除くほとんど全ての血漿タンパク質を合成する生体内最大の臓器である。今後、肝臓がPAの代謝臓器であることも考慮し、 h -PAの詳細な産生調節機構や生理作用のみならず、栄養状態や食餌条件、加齢と h -PA産生について *in vivo* 実験系で追究することで、今日大きな社会問題となっている血栓・塞栓性疾患の予防や治療に役立つ新たな基礎的知見を示すことができると考えている。

要約

線溶活性化酵素 (plasminogen activator, 以後 PA) は線溶酵素 plasmin の zymogen である plasminogen を活性化する serine protease の一種である。PA は生体内の種々の組織、体液に存在し、血栓の除去のみならず、結合組織や骨代謝、排卵、血清タンパク質のプロセッシング、癌の浸潤、転移等の生理的、病態生理的諸現象への関与が明らかにされている。

本論文は、PA の存在が疑われていた肝臓について、初代培養肝細胞を用いた *in vitro* 実験系や *in vivo* 実験系を用いて検討し以下のような知見を得た。

第1章では、ラット初代培養肝細胞系を用いて肝実質細胞が hepatic PA (h-PA) を産生することを fibrinolysis autography により細胞レベルで明らかにした。また、初代培養肝細胞培養液について zymography を行い h-PA の分子種を明らかにした。培養液中には分子量 60 k の h-PA と、一部約 40 k の低分子型 h-PA を検出した。40 k の低分子型 h-PA は細胞内には存在しないこと、また aprotinin (2 U/ml) を添加した培養液で培養を行った場合には観察されないことから、h-PA が細胞外に分泌される際、もしくは分泌後 aprotinin 感受性の酵素により何等かのプロセッシングを受けて生じたものと考えられた。

第2章では、h-PA 産生に適した肝細胞の培養法を検討し、初代培養肝細胞培養液から、CM-Sepharose を用いたイオン交換クロマトグラフィー、Arginine-Sepharose column, Benzamidine-Sepharose column を用いたアフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過 FPLC を用いて h-PA の高度精製法を確立した。その結果、初代培養肝細胞培養液 5,200 ml から比活性 42,800

IU/mg の h-PA 35 μ g を得ることができた。精製濃縮倍率は約 1,500 倍、回収率は 19 % であった。

さらに、精製 h-PA 標品のタンパク化学的性質、酵素学的性質について検討した。その結果、h-PA 活性は 60 $^{\circ}$ C、30 min の熱処理により約 60 % の活性が失われ、熱には比較的安定であった。h-PA 活性は中性付近で安定であり、アルカリ側でも比較的安定であったが、酸性側では不安定であった。また、h-PA の至適 pH は 8.0 で pH 8.7~9.2 に等電点を有する塩基性タンパク質であることが明らかとなった。

h-PA は urokinase 特異合成基質 S-2444 をほとんど分解しないが、組織型 PA (t-PA) 特異合成基質 S-2288 をよく分解 ($K_m = 0.36 \times 10^{-4}$ M) した。h-PA の fibrin 親和性は Fibrin-Separeose を用いて検討した結果、生理的塩濃度 (0.15 M) では fibrin に対してほとんど親和性を示さない urokinase とは異なり、h-PA は 0.5 M NaCl よりはじめて溶出され fibrin に対して強い親和性を示した。

h-PA は plasminogen, plasmin 特異合成基質 S-2251 を用いた parabolic assay において、ヒトメラノーマ細胞由来 t-PA 同様、stimulator (fibrinogen の臭化シアン分解物) 存在下で効率よく plasminogen を活性化した。

以上の結果から、h-PA がいわゆる組織型 PA (tissue type PA; t-PA) に分類されるものと考えられた。

第 3 章では、抗ラット h-PA ウサギ抗体を作製し h-PA の免疫学的性質について検討した。

抗 h-PA 抗体と、胆汁より A-A 法 (硫酸アンモニウム沈澱法とアセトン沈澱法を組み合わせた方法) により純化した bilokinase (BK)、各種組織よりロダナンモニウムにより抽出、粗分画した PA、尿のゲル濾過により分画した UK などとの反応性を活性のクエンチングにより検討した。

抗 h-P A 抗体は h-P A、B K の両者の活性を濃度依存的に抑制し、0.5~1.0 μ g/ml の低濃度の抗 h-P A 抗体で完全に抑制した。また、抗 h-P A 抗体は腎臓、肺、子宮、卵巣 P A の活性を 86~39 % 抑制し交差反応を示したが、U K 活性には影響を及ぼさず、U K とは交差反応を示さなかった。

このことから、h-P A は B K と免疫学的に同一の P A であるが、U K とは異なる分子であることが明らかとなった。

第 4 章では、初代培養肝細胞を用いた h-P A 産生測定系を確立し、種々の物質の h-P A 産生に及ぼす影響について検討した。

初代培養肝細胞系における h-P A 産生は insulin や E G F により影響を受けなかったが、epinephrine や glucagon により 1.5~2.5 倍増大した。また、h-P A の産生は cAMP phosphodiesterase inhibitor (3-isobutyl-1-methyl xanthine; IBMX) や adenylate cyclase の activator (forskolin) 等の細胞内 cAMP 濃度を増大させる物質により増大し、これらの薬剤やホルモンによる h-P A 産生増大機構に cAMP 情報伝達系の関与が示唆された。事実、h-P A 産生の増大は細胞内 cAMP 濃度の上昇とよく相関し、さらに、cAMP の analogue (dibutyl cAMP ; dbcAMP) の処理によっても h-P A 産生は濃度依存的に増大した。

cAMP による h-P A 産生増大は cAMP dependent protein kinase の inhibitor である H-8, actinomycin D, cycloheximide により抑制されたことから、h-P A 産生に cAMP dependent protein kinase や mRNA 合成、タンパク合成系が関与していると考えられた。

また、fibrin の plasmin 分解物である fibrin 分解産物 (fibrin degradation product ; FDP) の h-P A 産生に及ぼす影響についても検討した。

Fibrin の plasmin による安定分解終末産物である fragment D (D) , fragment E (E) は plasminogen-rich fibrinogen の streptokinase 分解物

より、DEAE-, CM-Sepharose column クロマトグラフィーにより精製した。Eは h-P A 産生に影響を及ぼさなかったが、D (100 μ g/ml) は h-P A 産生を 2.3 倍増大させ、h-P A 産生が末梢における血栓形成により影響を受ける可能性が示唆された。しかし、FDP による h-P A 産生の増大は、細胞内 cAMP 濃度の増大を伴わず、C-kinase の inhibitor, H-7 によっても抑制されなかった。このことは、FDP による h-P A 産生増大が cAMP-A-kinase 系を介した glucagon, epinephrine 等による産生増大とは異なる機序で惹起されていることを示しており、今後作用機作についての検討が必要であると考えられた。

Dexamethasone は h-P A 産生を強力に抑制し、 10^{-6} M では control の約 25 % に、また、 10^{-7} M 以上では完全に抑制された。Dexamethasone は肝細胞における plasminogen activator inhibitor (PAI) の産生を誘導することが知られている。しかしながら、初代培養肝細胞においては dexamethasone により PAI を含めた fibrinolytic inhibitor の誘導は観察されず、h-P A 産生そのものが dexamethasone により抑制されていることが明らかになった。

以上の結果は、ホルモン応答能をはじめとする肝機能を *in vivo* とほぼ同様に有すると思われる初代培養肝細胞を用いて、h-P A 産生が cAMP analogue や cAMP を second messenger として働く特定のホルモン、さらには、fibrin 分解産物により増大し、dexamethasone により減少することを始めて明らかにしたものである。

第 5 章では、h-P A の *in vivo* における生理的、病態生理的意義を明らかにする目的で、実験的肝硬変ラットにおける h-P A 産生について検討した。McLean らの四塩化炭素蒸気吸入法により作製した肝硬変ラットについて生化学的、組織化学的検討を行った。

コントロールラットの血漿 euglobulin 分画について行った zymography は分子量 60 k の h-P A と同一の位置に泳動される PA と、100 k の fibrin

分解活性とが認められた。一方、硬変群では 60 k と 100 k の fibrin 分解活性の他に、より高分子の位置に複数の fibrin 分解活性が検出された。これらの活性分子の本態については明らかでないが、肝硬変時に血中線溶活性が増大していることが PA 分子種の増加という面から明らかとなった。

また、fibrinolysis autography により h-PA の肝組織内局在を検討したところ、コントロールラット肝臓ではどの部位も活性をほとんど示さなかったが、硬変肝組織ではグリソン鞘周囲、特に胆管周囲に顕著な活性局在を示した。硬変肝組織で増大を認めたこの活性は、抗 h-PA 抗体により完全に抑制されたことから、初代培養肝細胞が産生する h-PA と免疫学的に同一な分子によるものであることが明らかとなった。

これらの成績は h-PA が肝臓の生理や病態と密接に関連すること、肝臓が PA のクリアランスを担う臓器であると同時に、PA 産生臓器でもあり、PA に関して肝臓は産生と代謝の 2 面性を有する唯一の臓器であることを示している。

以上、本論文では肝臓が PA を産生することを細胞レベルで明らかにし、肝 PA (h-PA) の性質や初代培養肝細胞系における産生調節機序について明らかにした。さらに、実験的肝硬変ラット肝臓において h-PA 産生が著増していることを見だし、h-PA が肝臓の生理や病態と密接に関連していることを明らかにした。

引用文献

- 1) 松尾 理 (1985) 『t-PA と Pro-UK』、学際企画
- 2) Duguid, J.B. (1949) Lancet, II, 925-927.
- 3) Doolittle, R. F., Bouma, III, H., Cottrell, B. A., Strong, D. and Watte, K. W. K. (1979) "The chemistry and physiology of the human plasma protein." , Pergamon Press, New York, Oxford, Tront, Sydney, Frankfurt, Paris, pp 77-95.
- 4) Wiman, B. (1978) "Fibrinolysis." , Academic Press, London, pp 47-60.
- 5) Robbins, K. C., Sammaria, L., Hsieh, B. and Shah, R. (1967) J. Biol. Chem., 242, 2333-2342.
- 6) 松尾 理 (1988) 実験医学、6, 1282-1286.
- 7) Strickland, S. and Beers, W. H. (1976) J. Biol. Chem., 251, 5694-5702.
- 8) Liu, Y. X., Peng, X. R. and Ny, T. (1991) Eur. J. Biochem., 195, 549-555.
- 9) Mullins, D. E. and Rohrllich, S. T.(1983) Biochim. Biophys. Acta, 695, 177-214.
- 10) Dano, K., Anderson, P. A., Grondahl-Hansen, J., Kristensen, P., Nielsen, L. S. and Skriver, L. (1985) Adv. Cancer Res., 44, 139-239.
- 11) Gunzler, W. A., Steffence, G. J., Otting, F., Kim, S-M. A., Frankus, E. and Flohe, L.(1982)Hopppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 363, 1155-1165.

- 12) Steffence, G., J., Gunzler, W. A., Otting, F., Frankus, E. and Flohe, L. (1982) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 363, 1043-1058.
- 13) 須見洋行 (1985) 化学と生物, 23, 228-236.
- 14) Albrechtsen, O. K. (1959) Acta Physiol. Scand., 47, 30-42.
- 15) Pennica, D., Holmes, W. E., Kohr, W. J., Harkins, R. N., Vehar, G. A., Ward, C. A., Bennett, W. F., Yelverton, E., Seeburg, P. H., Heyneker, H. L., Goeddel, D. V. and Collen, D. (1983) Nature, 301, 214-221.
- 16) Ny, T., Elgh, F. And Lund, B. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5355-5359.
- 17) Zonneveld, A. J., Veerman, H. and Pannekoek, H. (1986) J. Biol. Chem., 261, 14214-14218.
- 18) Ichinose, A., Takio, K. and Fujikawa, K. (1986) J. Clin. Inv., 78, 163-169.
- 19) Corasanti, J. G., Celik, C., Camiolo, S. M., Mittelman, A., Evers, J. L., Barbash, A., Hobika, G. H. and Markus, G. (1980) JNCI, 65, 341-351.
- 20) Rajput, B., Degen, S. F., Reich, E., Waller, E. K., Axelrod, J., Eddy, R. L. and Shows, T. B. (1985) Science, 230, 672-674.
- 21) Brian, A. L., Esther, R. and Clement, B. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun., 72, 462-471.
- 22) Williams, G. M., Bermudez, E, San, R. H., Goldblatt, P. J. and Laspi, M. F. (1978) In Vitro, 14, 824-837.
- 23) Sharoni, Y., Topal, M. C., Tuttle, P. R. and Berger, H. Jr. (1982) Thromb. Haemostas., 47, 166-172.
- 24) Oshiba, S. and Ariga, T. (1983) J. Biol. Chem., 258, 622-628.

- 25) Ariga, T., Oshiba, S., Seki, T., Imai, H., Imai, S. and Sawai, H.
(1989) Thromb. Res., 56, 37-48.
- 26) Seglen, P.O. (1976) Methods Cell Biol., 13, 29-83.
- 27) Tanaka, T., Sato, M., Tomita, Y. and Ichihara A. (1978)
J. Biochem., 87, 937-946.
- 28) Kruse, P.F., Jr. and Patterson, M.K., Jr. (1973)
"Tissue culture.", Academic Press, New York.
- 29) Hamashima, Y., Harter, J.G. and Coons, A. H. (1964)
J. Cell Biol., 20, 271-279.
- 30) Astrup, T. and Permin, P.M. (1948) Nature, 161, 489.
- 31) Todd, A.S. (1958) Nature, 181, 495-496.
- 32) Heussen, C. and Dowdle E.B. (1980) Anal. Biochem., 102, 196-202.
- 33) Laemmli U.K. (1970) Nature, 227, 680-685.
- 34) Ichihara, A., Nakamura, T., Tanaka, K., Tomita, Y., Aoyama, K.,
Katao, S. and Shinno, H. (1980) Ann. N.Y. Acad. Sci., 349, 77-84.
- 35) Ende, N. and Auditore, J. (1961) Am. J. Clin. Pathol., 36, 16-24.
- 36) 大柴 進、吉田真理子、今井英雄、今井一博、萩原茂樹、前川豊行(1986)
日本生理誌, 48, 641-648.
- 37) Kato, S., Aoyama, K., Nakamura, T. and Ichihara, A. (1979)
J. Biochem., 86, 1419-1425.
- 38) Kruihof, E.O., Tran-Thang, C., Ransijn, A. and Bachmann, F.
Blood, 64, 907-913.
- 39) Verheijen, J.H., Chang G.T.G. and Kluft, C. (1984)
Thromb. Haemostas., 51, 392-395.
- 40) Levin, E.G. and Loskutoff, D.J. (1980) Cell, 22, 701-707.
- 41) 関 泰一郎、渡辺一弘、鈴木秀佳、有賀豊彦 (1987) 日本大学農獣医学部

學術研究報告, 44, 99-104.

- 42) Haushka, S.D. and Konigsberg, I.R. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 55, 119-126.
- 43) Nakamura, T., Asami, O., Tanaka, K. and Ichihara, A. (1984) Exp. Cell Res., 155, 81-91.
- 44) Bernik, M.B. and Kwaan, H.C. (1969) J. Clin. Inv., 48, 1740-1753.
- 45) Weber, K. and Osborn, M. (1972) J. Biol. Chem., 244, 4406-4412.
- 46) Verheijen, J. H., Mullaart, E., Chang, G. T. G., Klufft, C. and Wijngaards, G. (1982) Thromb. Haemostas., 48, 266-269.
- 47) Rijken, D. C. and Collen, D. (1981) J. Biol. Chem., 256, 7035-7041.
- 48) Sueishi, K., Nanno, S., Okamura, T., Inoue, S. and Tanaka, K. (1982) Biochim. Biophys. Acta, 717, 327-336.
- 49) Rijken, D. C., Wijngaards, G., Jong, Z-D. and Welbergen. (1979) Biochim. Biophys. Acta, 580, 140-153.
- 50) Binder, B. R., Spragg, J. and Austen, K. F. (1979) J. Biol. Chem., 254, 1998-2003.
- 51) Itagaki, Y., Yasuda, H., Morinaga, T., Mitsuda, S. and Higashio, K. (1991) Agric. Biol. Chem., 55, 1225-1232.
- 52) Wu, M. C., Arimura, G. K. and Yuni, A.A. (1977) Biochemistry, 16, 1908-1913.
- 53) Klufft, C., van Wezel, A. L., van der Velden, C. A. M., Emeis, J.J., Verheijen, J. H. and Wijngaards, G. (1983) Adv. Biotech. Process, 2, 97-110.
- 54) Einarsson, M., Brandt, J., Kaplan, L. and Lennart, K. (1985) Biochim. Biophys. Acta, 830, 1-10.

- 55) Reagan, M. E., Robb, M., Bornstein, I. and Niday, E. G. (1985)
Thromb. Res., 40, 1-9.
- 56) Kacian, D. L. and Harvey, R. C. (1985) Arch. Biochem. Biophys.,
236, 354-369.
- 57) Ogawa, N., Yamamoto, H., Katamine, T. and Tajima, H. (1975)
Thromb. Diathes. Haemorrh., 34, 194-209.
- 58) 関 泰一郎、渡辺一弘、有賀豊彦 (1987) 日本農芸化学会昭和 62 年度大
会講演要旨集、309.
- 59) McFarlane, A. S. (1958) Nature, 53, 4627.
- 60) Barlow, G. H. and Lazer, L. (1972) Thromb. Res., 1, 201-208.
- 61) Kusinski, C. S., Fletcher, A. P. and Sherry, S. (1968)
J. Clin. Inv., 47, 1238.
- 62) Kok, P. (1979) Throm. Haemostas., 41, 718-744.
- 63) Bernik, M. B., White, W. F., Oller, E. P. and Kwaan, H. C.
(1974) J. Lab. Clin. Med., 84, 546-558.
- 64) Rijken, D. C., Wijngaards, G. and Welbergen, J. (1981)
J. Lab. Clin. Med., 97, 477-486.
- 65) Rijken, D. C., Wijngaards, G. and Welbergen, J. (1980)
Throm. Res., 18, 815-830.
- 66) Christman, J.K., Silverstein, S. C. and Acs, G. (1977)
"Proteinases in Mammalian Cells and Tissues.", North-Holland
Publishing Co., Amsterdam, pp 91-149.
- 67) Seki, T., Ariga, T., Saitoh, K., Sugawara, T. and Oshiba, S.
(1990) Thromb. Res., 58, 543-554.
- 68) Tanaka, T., Sato, M., Tomita, Y. and Ichihara A. (1978)
J. Biochem., 87, 937-946.

- 69) Friedman, D., Claus, T., Pilgis, S. and Pine, G. (1981)
Exp. Cell Res., 135, 283-290.
- 70) McGowan, J. A., Strain, A. J. and Bucher, N. L. (1981)
J. Cell. Physiol., 108, 353-363.
- 71) 平田結喜緒 (1984) "細胞成長因子"、朝倉書店 (東京), pp 20-30.
- 72) Noguchi, T., Diesterhaft, M. and Granner D. (1978) J. Biol. Chem.,
253, 1332-1335.
- 73) Bachrach, U. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3087-3091.
- 74) Beale, E. G., Hartley, J. L. and Granner, D.K. (1982)
J. Biol. Chem., 257, 2022-2028.
- 75) Deam, D. C., McQuillan, J. J. and Weintraub, S. (1990)
J. Biol. Chem., 265, 3522-3527.
- 76) Montmini, M.R., Sevarino, K.A., Wagner, J.A., Mandel, G. and
Goodman, R.H. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 6682-6686.
- 77) Mierendorf Jr., R. C. and Muller, G. C. (1982) J. Biol. Chem.,
257, 4496-4500.
- 78) Guertin, M., Bartkowiak, P., Anderson, A. and Belanger, L. (1983)
Biochemistry, 22, 4296-4302.
- 79) Eberwine, J. H. and Roberts, J. L. (1984) J. Biol. Chem., 259,
2166-2170.
- 80) Sprengers, E. D., Princen, H. M. G., Kooistra, T. and
Van Hinsbergh, V. W. M. (1985) J. Lab. Clin. Med., 105, 751-758.
- 81) Seifert, S. C. and Gelehrter T. D. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA, 75, 6130-6133.
- 82) 有賀豊彦、小笠原芳宏、遠藤英二、大柴進 (1985) 血液と脈管、16,
33-35.

- 83) 小笠原芳宏、有賀豊彦、遠藤英二、大柴進 (1985) 血液と脈管、16,
36-38.
- 84) Girman, G., Peers, H., Schwarze, G. and Schleurlen, P.G. (1976)
Nature, 259, 399-401.
- 85) Nham, S.U., and Fuller, G. M. (1986) Thromb. Res., 44, 467-475.
- 86) Ritchie, D. G., Levy, B. A., Adams, M. A. and Fuller, G. M. (1982)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1530-1534.
- 87) Wang, Y. and Fuller, G. M. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun.,
175, 562-567.
- 88) Fuller, G. M. and Ritchie, D. G. (1982) Ann. N.Y. Acad. Sci.,
389, 308-322.
- 89) Hatzfield, J. A., Hatzfield, A. and Maigne, J. (1982) Proc. Natl.
Acad. Sci. USA, 79, 6280-6284.
- 90) 越智 宏、室田誠逸 (1988) 実験医学 6, 42-47.
- 91) McLean, E. K., McLean, A. E. M. and Sutton, P. M. (1969)
Br. J. Exp. Path., 50, 502-506.
- 92) Schneider, W. C. (1945) J. Biol. Chem., 161, 293-303.
- 93) Burton, K. (1955) Biochem. J., 62, 315-323.
- 94) Matsuoka, M., Satake, K. and Fukazawa, T. (1958) Rinsho Kensa, 2,
61-64.
- 95) Koneff, A.A. (1938) Stain. Technol., 13, 49-52.
- 96) Recknagel, R. O. (1967) Pharmacol. Rev., 19, 145-208.
- 97) Lane, D. A. (1977) Br. J. Haematol., 35, 301-308.
- 98) Martinez, J. (1978) J. Clin. Inv., 61, 535-538.
- 99) Watanabe, A., Hayashi, S., Higashi, T., Obata, T., Sakata, T.,
Takei, T., Shiota, T. and Nagashima, H. (1982)

Gastroenterol Jpn., 17, 218-223.

- 100) He, C. J., Rebibou, J. M., Peraldi, M. N., Meulders, Q. and Rondeau, E. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun., 176, 1408-1416.
- 101) Nillson, S., Einaesson, M., Ekvarn, S. and Haggroth, Mattsson, C. H. (1985) Thromb. Res., 39, 511-521.
- 102) Emeis, J. J., van den Hoogen, C. M. and Jense, D. (1985) Thromb. Haemostas., 54, 661-664.
- 103) Oshiba, S., Imai, H., Sawai, H., Imai, S., Takao, K., Suzuki, H. and Ariga, T. (1990) Nihon Univ. J. Med., 32, 355-363.
- 104) Mullins, D. E. and Rohrllich, S. T. (1983) Biochim. Biophys. Acta., 695, 177-214.
- 105) Nakamura, T., Nawa, K. and Ichihara, A. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun., 122, 1450-1459.
- 106) Nakamura, T., Teramoto, H. and Ichihara, A. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 6489-6493.
- 107) Nakamura, T., Nawa, K., Ichihara, A., Kaise, N. and Nishino, T. (1987) FEBS Lett., 224, 311-316.
- 108) Kinoshita, T., Tashiro, K. and Nakamura, T. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun., 165, 1229-1234.
- 109) Masumoto, A. and Yamamoto, N. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun., 174, 90-95.
- 110) Kruthof, E.K.O. and Schleuning, W-D. Bachmann. (1985) Biochem. J., 226, 631-636.
- 111) 深澤洋子 (1992) 日本大学修士論文
- 112) Lee, L-S. and Weinstein, I.B. (1978) Nature, 274, 696-697.
- 113) Crutchley, D. J. and Maynard, J.R. (1983) Biochim. Biophys. Acta.

762, 76-85.

- 114) Crutchley, D. J. and Smariga, P. E. (1987) J. Biol. Chem., 262, 3017-3021.
- 115) Crutchley, D. J. and Smariga, P. E. (1986) Biochim. Biophys. Acta, 886, 26-32.
- 116) Wigler, M. and Weinstein, I.B. (1976) Nature, 259, 232-233.
- 117) Pearson, D., Altus, M. S., Horiuchi, A. and Nagamine, Y. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun., 143, 329-336.
- 118) Jans, D. A., Resink, T., J. and Hemmings, B. A. (1987) Biochem. J., 243, 413-418.
- 119) Fransis, R. B. Jr. and Neely, S. (1989) Biochim. Biophys. Acta, 1012, 207-213.
- 120) Kooistra, T., Van Den Berg, J., Tons, A., Platenburg, G., Rijken, D. C. and Van Den Berg, E. (1987) Biochem. J., 247, 605-612.
- 121) Lasiererra, J., Aza, M. J., Poblet, S., Barrao, F. Bayon, E. and Gonzalez, J. (1991) Thromb. Res., 5, 117-120.
- 122) Krause, J., Seydel, W., Heinzl, G. and Tanswell, P. (1990) Biochem. J., 267, 647-652.
- 123) Wing, L. R. (1991) FEBS, 278, 95-97.
- 124) Marks, G. J., Hart, T. K., Rush, G. F., Hoffstein, S. T., Fong, K.L.L. and Bugelski, P. J. (1990) Thromb. Haemostas., 63, 251-258.
- 125) Rijken, D. C., Otter, M., Kuiper, J. and Van Berkel, Th. J. C. (1990) Throm. Res., 10, 63-71.
- 126) Smedsrod, B. and Einarsson, M. (1990) Thromb. Haemostas., 63, 60-66.

謝 辞

ラット肝線溶活性化酵素に関する研究テーマを与えて下さり、研究遂行にあたり並々ならぬお力添え、御指導を頂きました、日本大学農獣医学部農芸化学科栄養生理化学研究室研究室、有賀豊彦 教授に深く感謝いたします。

本研究を行うに当たり、終始適切な御指導を頂きました東京大学農学部農芸化学科栄養化学教室、野口 忠 教授、高橋伸一郎 助教授に厚く御礼申し上げます。

また、免疫組織化学的研究において共同研究して下さいました日本大学医学部 今井英雄 講師（現 大正製薬株式会社 総合研究所）に感謝いたします。

そして、研究に協力して下さいました日本大学農獣医学部農芸化学科栄養生理化学研究室研究室内の皆様、東京大学農学部農芸化学科栄養化学教室の加藤久典助手、三浦 豊助手（現 東京農工大学助手）、竹中麻子助手をはじめ研究室の皆様に深く感謝いたします。

最後に、本研究を陰で支えてくれました家族に感謝いたします。

